

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



## **TESIS DOCTORAL**

Alteraciones inducidas por fipronil sobre el metabolismo aminoacidérgico  
en el sistema nervioso central de rata macho adulto

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marta Portolés Méndez

Directores

Arturo Ramón Anadón Navarro  
Alejandro Romero Martínez  
Eva Ramos Alonso

**Madrid, 2018**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**ALTERACIONES INDUCIDAS POR FIPRONIL  
SOBRE EL METABOLISMO AMINOACIDÉRGICO  
EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA  
MACHO ADULTO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**MARTA PORTOLÉS MÉNDEZ**

**Bajo la dirección de los Profesores Doctores**

**Arturo Ramón Anadón Navarro**

**Alejandro Romero Martínez**

**Eva Ramos Alonso**

**Madrid, 2017**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**ALTERACIONES INDUCIDAS POR FIPRONIL  
SOBRE EL METABOLISMO AMINOACIDÉRGICO  
EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA  
MACHO ADULTO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**MARTA PORTOLÉS MÉNDEZ**

**Bajo la dirección de los Profesores Doctores**

**Arturo Ramón Anadón Navarro**

**Alejandro Romero Martínez**

**Eva Ramos Alonso**

**Madrid, 2017**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**ALTERACIONES INDUCIDAS POR FIPRONIL  
SOBRE EL METABOLISMO AMINOACIDÉRGICO  
EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA  
MACHO ADULTO**

**Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por la  
Universidad Complutense de Madrid  
Departamento de Toxicología y Farmacología**

**MARTA PORTOLÉS MÉNDEZ**

**Madrid, 2017**



Trabajo financiado por:

- Proyecto Grupo de Investigación UCM: 920204 TOXIAQBI, Ref. GR3/14  
“Toxicología y Seguridad de Agentes Químicos y Biológicos”.  
Programa de financiación de la UCM-Banco de Santander, para Grupos de Investigación UCM validados.
- Convenio de Colaboración entre el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental y Medio Natural) y la Universidad Complutense de Madrid para la “Evaluación científica de datos toxicológicos y ecotoxicológicos sobre productos químicos y biotecnológicos y su vinculación con los Reglamentos REACH y CLP y la normativa nacional y comunitaria sobre los organismos modificados genéticamente”.





Deseo expresar mi agradecimiento,

A mis Directores de Tesis Doctoral, Profesor Dr. D. Arturo Anadón Navarro, Catedrático de Toxicología y Legislación Sanitaria, y a los Profesores Dra. Eva Ramos Alonso, y Dr. Alejandro Romero Martínez, Prof. Contratados Interinos de Toxicología, del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid por todas sus enseñanzas, confianza y el apoyo recibido a lo largo de este periodo de mi formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.

A mis compañeros del Grupo de Investigación de Toxicología del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Universidad Complutense de Madrid por la ayuda recibida, en particular a la Prof. Dra. María Rosa Martínez Larrañaga, Catedrática de Toxicología y a la Prof. Dra. María Aránzazu Martínez Caballero, Prof. Titular de Toxicología y a la Prof. Dra. Irma Ares Lombán, Prof. Contratada de Toxicología, que me han animado y ayudado siempre para la realización y consecución de este trabajo.

A la Dra. Ana Fresno Ruíz, a la Dra. Carmen Ramos Schlegel y a D. Manuel Carbó Martínez, por su apoyo incondicional a lo largo de estos años. A mis compañeras de despacho, gracias por haberme sabido escuchar.

Me gustaría dar las gracias de una manera muy especial a mi compañera Marina Paz Sánchez, por haberme hecho creer cada día que podía hacerlo. Este trabajo también te pertenece.

A mi familia, gracias por haberme sabido entender durante estos años y sobre todo por haber estado ahí de forma incondicional, apoyándome, no dejándome en momentos de desesperación y dándome la fuerza necesaria para llegar hasta el final.

A mis padres, porque sin ellos nada habría sido posible. Gracias por vuestros esfuerzos para que llegara a tener la formación que poseo hoy en día. Porque sin vosotros no sería la persona que hoy soy.

A Javi. Gracias por la paciencia, por saberme escuchar, por todos tus granitos de arena, por no dejarme caer, por estar siempre a mi lado, en los buenos y malos momentos, animándome siempre a continuar. Porque esta Tesis es también tuya.



A Claudia. Por ser la luz en mi camino. Todo es por ti y para ti. «Lo más grande y lo más  
pequeñito de mi vida».





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID

**Departamento de Toxicología  
y Farmacología  
Facultad de Veterinaria  
28040 Madrid**

Prof. Dr. Arturo Ramón Anadón Navarro, Catedrático de Toxicología del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

Prof. Dr. Alejandro Romero Martínez, Profesor Contratado Doctor Interino de Toxicología del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

Prof. Dra. Eva Ramos Alonso, Profesora Contratada Doctor Interino de Toxicología del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

**CERTIFICAN que Dña. MARTA PORTOLÉS MÉNDEZ**

Ha realizado bajo nuestra dirección su Tesis Doctoral titulada **“Alteraciones inducidas por fipronil sobre el metabolismo aminoacidérgico en el sistema nervioso central de rata macho adulto”** en el Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Madrid, a veintiuno de abril de dos mil diecisiete.

Prof. Dr. Arturo Ramón Anadón Navarro

Prof. Dr. Alejandro Romero Martínez

Prof. Dra. Eva Ramos Alonso



# ***ÍNDICE***





<b>ÍNDICE.....</b>	<b>17</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>21</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>29</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>37</b>
<b>1.1. SISTEMA AMINOACIDÉRGICO .....</b>	<b>38</b>
1.1.1. AMINOÁCIDOS TRANSMISORES .....	40
<b>1.2. TOXICOLOGÍA DEL FIPRONIL .....</b>	<b>53</b>
1.2.1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL FIPRONIL .....	53
1.2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DEL FIPRONIL .....	55
1.2.2.1. Acción del fipronil sobre el sistema gabaérgico .....	55
1.2.2.1.1. GABA y los receptores GABAérgicos asociados a canales de Cl <sup>-</sup> en mamíferos .....	57
1.2.2.1.2. GABA y los receptores GABAérgicos asociados a canales de Cl <sup>-</sup> en invertebrados .....	66
1.2.2.1.3. Acción del fipronil sobre receptores GABAérgicos asociados a canales de Cl <sup>-</sup> .....	70
1.2.3. OTROS MECANISMOS DE ACCIÓN .....	79
1.2.3.1. Receptores de glutamato .....	79
1.2.3.2. Receptores de histamina .....	81
<b>1.3. ESPECTRO DE ACCIÓN Y USOS DEL FIPRONIL.....</b>	<b>82</b>
<b>1.4. ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN, EXCRECIÓN Y METABOLISMO DEL FIPRONIL.....</b>	<b>87</b>
<b>1.5. TOXICIDAD DEL FIPRONIL EN MAMÍFEROS.....</b>	<b>93</b>
<b>1.6. TOXICIDAD DEL FIPRONIL EN EL MEDIO AMBIENTE ACUÁTICO .....</b>	<b>101</b>
<b>1.7. OBJETIVO DEL TRABAJO .....</b>	<b>103</b>
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>107</b>
<b>2.1. PROTOCOLO Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>107</b>
<b>2.2. MÉTODO ANALÍTICO: DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS NEUROTRANSMISORES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN Y DETECCIÓN FLUORIMÉTRICA .....</b>	<b>112</b>
<b>2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS.....</b>	<b>117</b>
<b>2.4. REACTIVOS .....</b>	<b>117</b>
<b>2.5. APARATOS Y MATERIALES UTILIZADOS .....</b>	<b>118</b>
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>121</b>
<b>3.1. VARIACIONES DE LA CONCENTRACIÓN DE AMINOÁCIDOS A NIVEL CEREBRAL EN RATA MACHO ADULTA EXPUESTA AL FIPRONIL .....</b>	<b>122</b>
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>135</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>149</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>153</b>



# ***RESUMEN***



## ***RESUMEN***

**Introducción.** El fipronil es un insecticida de segunda generación perteneciente a la familia de los fenilpirazoles cuyos efectos tóxicos se observan tanto en organismos diana como en otros organismos provocando, entre otros, neurotoxicidad ya que tiene como principal mecanismo de acción el ser antagonista del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) pues actúa bloqueando los receptores GABAérgicos asociados a los canales de cloro de los insectos y ácaros, produciendo una hiperexcitación neuronal a bajas dosis y como consecuencia la parálisis y la muerte de éstos a dosis elevadas. Se trata, por tanto, de un pesticida con alta popularidad ya que parece exhibir un alto grado de selectividad por los receptores de las células nerviosas de insectos en relación a los de mamíferos, aumentando el umbral de seguridad para personas y animales. Porque nuevos datos de toxicidad son necesarios para una mejor evaluación del riesgo, el objetivo del presente trabajo es evaluar los potenciales efectos neuroquímicos del fipronil sobre los principales neurotransmisores (aminoácidos) en las distintas regiones cerebrales, en ratas macho adultas expuestas oralmente a dosis múltiples, investigación a nuestro conocimiento no descrita en la literatura científica. Las regiones cerebrales estudiadas fueron hipófisis, hipotálamo, cerebelo, bulbo raquídeo, corteza cerebral, hipocampo, cuerpo estriado y mesencéfalo y los aminoácidos fueron aspartato, glutamato, glutamina taurina y GABA.

**Material y métodos.** Se emplearon 20 ratas Wistar macho, de 7 semanas de edad con un peso corporal medio de  $200 \pm 10$  g. El estudio se llevó a cabo de acuerdo a los requerimientos éticos, y fue aprobado por el Comité de Experimentación Animal de la UCM. Los animales se distribuyeron en cuatro grupos formado cada uno de ellos por 5 ratas (grupo control, grupo I, grupo II y grupo III). Los animales del grupo control recibieron aceite de maíz por vía oral, durante 5 días; los animales de los grupos tratados recibieron vía oral 5 mg, 10 mg y 15 mg fipronil/kg p.c./día durante 5 días respectivamente; fipronil que fue disuelto en aceite de maíz. Los animales se sacrificaron por decapitación, 3 horas después de recibir la última dosis de tratamiento, aislándose en frío rápidamente las regiones cerebrales objeto de estudio, y almacenándolas posteriormente a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El análisis y cuantificación de los aminoácidos

neurotransmisores se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección de fluorescencia tras una reacción de derivatización con O-phthaldialdehyde (OPA) en medio alcalino, y utilizándose dos fases móviles en gradiente. Las rectas de calibrado fueron lineales a las concentraciones de 10,5, 21, 42, 84, 210, 420 µg/ml. Los coeficientes de variación intra-día e inter-día fueron inferiores al 4%. En las muestras tisulares de SNC la recuperación analítica media fue del 100% para los cinco aminoácidos ensayados.

**Resultados y discusión.** El tratamiento oral de fipronil afectó de forma dosis-dependiente al contenido de los aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA en las regiones del SNC estudiadas observándose una disrupción del balance homeostático en el contenido de dichos aminoácidos analizados, así como en la regulación de su metabolismo, que sugiere una interrupción de los procesos de transmisión sináptica, hiperexcitación y en último término la muerte neuronal debido a la exposición a este pesticida. Podemos resaltar que, tras la exposición oral al fipronil, se observaron dos respuestas neurotóxicas distintas en base al contenido de los aminoácidos evaluados y, en función de las regiones cerebrales analizadas. En cerebelo, cuerpo estriado y mesencéfalo, se evidenció un aumento de manera global de las concentraciones de aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA y, por el contrario, en hipófisis, hipotálamo e hipocampo se detectó una disminución de las concentraciones de dichos aminoácidos. Asimismo, tras la administración de la dosis más alta de 15mg/kg, el fipronil indujo en la corteza cerebral un aumento de la concentración de GABA, lo que puede relacionarse con potenciales desórdenes neurodegenerativos similares en su comportamiento a enfermedades de tipo Parkinsoniano, Alzheimer o demencias derivadas de la destrucción neuronal producida por los procesos de excitotoxicidad, demostrando que el fipronil puede producir daños a nivel del SNC.

**Conclusiones.** El presente trabajo de investigación demuestra que la administración oral de fipronil, a las dosis de 5, 10 y 15 mg/kg p.c., durante 5 días consecutivos, en ratas Wistar macho adultas altera, de forma dosis-dependiente, en el SNC los niveles de los aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA. Estos nuevos datos de efectos neuroquímicos aportan una información relevante acerca de un nuevo mecanismo de acción neurotóxica del

fipronil, evidencia que sugiere una posible relación entre la exposición a pesticidas tipo fipronil y el probable desarrollo de patologías que cursan con un patrón neurodegenerativo.

## ***ABSTRACT***

**Introduction.** The fipronil is a second generation pesticide belonging to the phenilpyrazole family, whose toxic effects in target and non-target organisms provoke neurotoxicity, because it is antagonist of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) as its main action mechanism, is blocking the GABAergic receptors associated to the  $\text{Cl}^-$  channels of both insects and mites. It provokes neuronal hyper-excitation with small doses, but paralysis and finally death with high ones. Therefore, this is a really popular pesticide as it seems to exhibit a high of selectivity by the insects nervous cells compared with mammals, increasing the safety margin for people and animals. Because new data are necessary to be used in a further risk assessment, the aim of the present study is to evaluate the potential neurochemical effects of fipronil over the main neurotransmitters (amino acids) in the different cerebral regions over adult male rats exposed to multiple oral doses, research to our knowledge not described in the scientific literature. The cerebral regions analysed were pituitary gland, hypothalamus, cerebellum, medulla oblongata, frontal cortex, hippocampus, striatum and midbrain, while the amino acids were aspartate, glutamate, glutamine, taurine and GABA.

**Material and Methods.** 20 adult 7-week-old male Wistar rats were used, and their average weight was around  $200 \pm 10$  grams. The study was performed in accordance with all the ethical requirements and was approved by the UCM Ethical Experimental Animal Committee. The rats were divided in four groups with 5 animals per group; control group, group I, group II and group III). The animals belonging to the control group were orally treated with corn oil during 5 days, and rest of the animals from the treated groups were orally treated with 5 mg, 10 mg and 15 mg fipronil/kg bw/day respectively, during 5 days also; fipronil was dissolved in corn oil. The animals were euthanized by decapitation 3 hours after the last treatment dose, and the cerebral regions to be studied were dissected out on ice and stored at  $-80^\circ \text{C}$  until assay. The analysis and



quantification of amino acid neurotransmitters was done by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with fluorimetric detection after derivatization reaction with O-phthaldialdehyde (OPA) in alkaline medium, using two gradient mobile phases. The calibration lines were linear at the concentrations of 10.5, 21, 42, 84, 210, 420 µg/ml. Within-day and between-day assay coefficients of variation were less than 4%. Mean analytical recovery was 100% for the five amino acids in the tissue samples assayed.

**Results and Discussion.** The oral treatment of fipronil affected the content of aspartate, glutamate, glutamine, taurine and GABA amino acids in a dose-dependent way in the CNS regions analysed. Additionally, it was observed a disruption of the homeostatic balance in the content of those analysed amino acids, as well as in their metabolism regulation, resulting in the interruption of the synaptic transmission processes, hyper-excitation, and finally neuronal death due to the exposition to this pesticide. It must be remarked that after the oral exposition, two different neurotoxic responses were observed based on both the content of evaluated amino acids and the cerebral regions analysed: in cerebellum, striatum and midbrain, there was a global increase in the concentration of aspartate, glutamate, glutamine, taurine and GABA. However, in the pituitary gland, hypothalamus and hippocampus, it was detected a decrease of those amino acids. In the same way, after the application of the highest dose of 15 mg/kg, the fipronil induced an increase of GABA concentration in the frontal cortex, what can be linked to a potential neurodegenerative disorders similar to the ones in Parkinson's-type and Alzheimer's diseases, or dementia derived from the neuronal destruction caused by the excite-toxicity. This demonstrates that fipronil is able to cause damages on the CNS level.

**Conclusions.** The present investigation study demonstrates that the oral exposition with fipronil to the 5, 10 and 15 mg/kg bw/day doses, during 5 consecutive days in adult male Wistar rats alters in a dose dependent manner the levels of aspartate, glutamate, glutamine, taurine and GABA amino acids in the CNS. This new data about neurochemical effects gives relevant information about a new neurotoxic action mechanism of fipronil and gives evidences of a

## RESUMEN

---

possible connection between fipronil-type pesticides exposition and the probably development of diseases with a neurodegenerative pattern on course.



# ***ABREVIATURAS***



## ***ABREVIATURAS***

5HT<sub>3</sub>: Receptor de serotonina tipo 3

Ac-CoA: Acetil-coenzima A

Ala: Alanina

AMPA: Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico

AMPC: Monofosfato de adenosina cíclico

APPA: Ácido 3-amino-propil-fosfínico

Arg: Arginina

Asp: Aspartato

AST: Aspartato aminotransferasa

b<sub>5</sub>: Citocromo b<sub>5</sub>

Baclofeno: Ácido (R)-4-amino-3-(4-clorofenil)butanoico

BIDN: 3,3-bis-(trifluorometil)-biciclo[2.2.1.]heptano-2,2-dicarbonitrilo

BZ1 o  $\omega$ 1: Benzodiazepinas de “tipo I”

BZ2 o  $\omega$ 2: Benzodiazepinas de “tipo II”

°C: Grados Celsius

Ca<sup>2+</sup>:IÓN calcio

CACA: Cis-4-ácido aminocrotónico

CAMP: Ácido ( $\pm$ )-*cis*-2-(aminometil)-ciclopropano-1-carboxílico

CAS: Chemical Abstracts Service

CE<sub>50</sub>: Concentración efectiva media

CF<sub>3</sub>: Trifluorometil

CGP54626: Ácido [S-(R,R)]-[3-[[1-(3,4-diclorofenil)etil]amino]-2-hidroxipropil]  
(ciclohexilmetil)fosfínico

## ABREVIATURAS

---

CI<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria media

cm: Centímetro

Cl<sup>-</sup>: Ión cloruro

CL<sub>50</sub>: Concentración letal media

CPF: Corteza prefrontal

CSD: Ácido cisteín sulfínico descarboxilasa

CYP: Citocromo P450

DAG: Diacilglicerol

DL<sub>50</sub>: Dosis letal media

DMCM: Metil-6,7-dimetoxi-4-etil-β-carbolín 3-carboxilato

DMSO: Dimetilsulfóxido

EAAT: Transportador de aminoácidos excitatorios

EBOB: 1-[(4-etinil)fenil]-4-n-propil-2,6,7-trioxabicyclo[2.2.2]octano

ECHA: Agencia Europea de Productos Químicos

EE.UU.: Estados Unidos

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EPA (USEPA): Agencia para la Protección del Medio Ambiente de los EE.UU.

ESM.: Error estándar de la media

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

μg: Microgramo

g: Gramo

GABA: Ácido γ-aminobutírico

GABA-T: GABA transaminasa

GAD: Glutamato descarboxilasa

## ABREVIATURAS

---

GHS: Sistema global armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos

Gln: Glutamina

Glu: Glutamato

GluCl<sub>s</sub>: Receptores de glutamato asociados a canales de Cl<sup>-</sup>

Glu-R: Receptores glutamatérgicos postsinápticos

Gly: Glicina

GRD: Receptor de *Drosophila melanogaster* similar al GABA<sub>A</sub> y al receptor de glicina

GS: Glutamina sintetasa

GSH: Tripéptido glutatión

h: Hora

HisCl: Receptores asociados a canales de Cl<sup>-</sup>

HOMO: Homoserina

HPLC-F: Cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia

IDA: Ingesta diaria admisible

i.p.: Intraperitoneal

JMPR: Comité Conjunto de la FAO y de la OMS para la Evaluación de Residuos de Pesticidas

K<sup>+</sup>: Ión potasio

KA: Kainato

kDa: Kilodalton

K<sub>f</sub>: Coeficientes de adsorción de Freundlich

$\alpha$ -KG:  $\alpha$ -cetoglutarato

kg: Kilogramo

$\mu$ L: Microlitro

LCCH3: Canal asociado a canales de Cl<sup>-</sup> homólogo 3



LGIC: Canales iónicos dependientes de ligando

LMRs: Límites máximos de residuos

LOAEL: Nivel mínimo de efecto adverso observable

µm: Micrometro

µM: Micromol/litro

M: Molar (mol/litro)

MB 45950: Derivado sulfuro del fipronil

MB 46030: Fipronil

MB 46136: Derivado sulfona del fipronil

MB 46513: Destiofipronil

mg: Miligramo

Mg <sup>2+</sup>: ión magnesio

mGluR: Receptor metabotrópico de glutamato

min: Minuto

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mM: Milimol/litro

mV: Milivoltio

miliQ: Miliequivalentes

N: Normalidad

Na<sup>+</sup>: Ión sodio

NaOH: Hidróxido de sodio

nAChR δ : Receptor de Acetilcolina tipo δ

ng: Nanogramo

nm: Nanómetro

nM: Nanomol/litro

NMDA: Ácido N-metil-D-aspartato

NOAEL: Nivel sin efecto adverso observable

OMS/WHO: Organización Mundial de la Salud

OPA: O-phthaldialdehyde

PAG: Glutaminasa activada por fosfato

p.c.: Peso corporal

p. ej.: Por ejemplo

POW: Coeficiwnte de partición octanol-agua

p/p: peso/peso

ppm: Partes por millón

PTX: Picrotoxina

p/v: peso/volumen

RDL: Subunidad resistente a dieldrín

RfD: Dosis de Referencia Aguda

RPA 104615: Derivado sulfónico del fipronil

RPA 200766: Derivado amida del fipronil

r.p.m.: Revoluciones por minuto

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SCF<sub>3</sub>: Trifluoruro de escandio

Ser: Serina

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>: Trifluorometanosulfonilo

SSADH: Succinato semialdehído deshidrogenasa

[<sup>35</sup>S]TBPS: [<sup>35</sup>S]tert-butilbiciclofosforotionato

spp.: Especies

Suc: Succinato

t<sub>1/2</sub>: Semivida de eliminación

Tau: taurina

TBOB: Biciclo-o-benzoato de t-butiloTBPS

TBPS: Biciclofosforotionato de 4-t-butilo

THIP: 4,5,6,7-tetrahidroisoxazolo[5,4-c]piridín-3-ol

TM: Transmembrana

TPMPA: Ácido (1,2,5,6-tetrahidropiridín-4-il) metilfosfínico

U.E.: Unión Europea

USEPA (EPA): Agencia para la Protección del Medio Ambiente de los EE.UU.

VGLUT: Molécula transportadora de glutamato

vs: Versus

v/v: Volumen/volumen

X: Media

Zn<sup>2+</sup>: Iones de Zinc

# ***INTRODUCCIÓN***



### ***1. INTRODUCCIÓN***

La neurotoxicología como campo científico se ocupa del estudio de los efectos adversos en la estructura y/o función del sistema nervioso, provocados en las diversas especies incluido el hombre, por la exposición a un xenobiótico bien durante su etapa de desarrollo o en la madurez. Los efectos estructurales darán lugar a cambios neuroanatómicos mientras que los efectos funcionales producirán cambios neuroquímicos, neurofisiológicos y/o cambios en el comportamiento. Se estima que entre un 3-28% de todos los productos químicos comercializados para los diferentes usos (p. ej. para uso doméstico, higiene personal, agrícola y medicamentos, entre otros) pueden ser neurotóxicos (Dorman *et al.*, 2002). Uno de los principales problemas que ha llevado al interés por conocer los posibles efectos neurotóxicos de las distintas sustancias químicas comercializadas y de uso diverso es la complejidad del sistema nervioso y la limitada capacidad de reparación, una vez se ha producido el efecto. Esta elevada complejidad del sistema nervioso se debe a que las distintas regiones están relacionadas entre sí de forma anatómica y funcional, de manera que los efectos en una zona se pueden manifestar también en otras distintas partes del sistema nervioso (Toga, 1997; Augustinack *et al.*, 2005).

La neurotoxicidad es un término que hace referencia a aquellas alteraciones funcionales, estructurales y bioquímicas producidas en el sistema nervioso y que conllevan la manifestación de diferentes clases de efectos adversos como consecuencia de una exposición a un producto químico. Ya ha sido sumamente comprobado que la exposición a determinadas sustancias tóxicas de uso agrícola e industrial puede dañar el sistema nervioso, con los consiguientes daños neurológicos y conductuales. Los síntomas de neurotoxicidad incluyen debilidad muscular, pérdida de sensibilidad y control motor, temblores, alteraciones de la cognición y trastornos en el funcionamiento del sistema nervioso autónomo. El SNC está compuesto por el cerebro y la médula espinal y es responsable de las funciones superiores del sistema nervioso (reflejos condicionados, aprendizaje, memoria, juicio y otras funciones de la mente). Las sustancias

químicas tóxicas para el SNC pueden inducir confusión, fatiga, irritabilidad y otros cambios del comportamiento, así como también enfermedades cerebrales y degenerativas (encefalopatías).

El mecanismo de acción principal descrito para el fipronil, insecticida objeto de nuestro estudio, consiste en el bloqueo de canales de iones de cloro ( $\text{Cl}^-$ ) asociados a receptores GABAérgicos, provocando así una hiperexcitación neuronal que finalmente causa la muerte del animal (Colliot *et al.*, 1992). La principal ventaja del fipronil, con respecto a otros insecticidas y acaricidas con mecanismo de acción sobre el sistema GABAérgico, consiste en que tiene una acción preferente sobre canales de  $\text{Cl}^-$  asociados a receptores GABAérgicos de especies invertebradas. Es decir, por el momento parece poseer una toxicidad más selectiva frente a invertebrados que frente a mamíferos.

El fipronil, [5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil) fenil]-4-(trifluorometilsulfinil)-1H-pirazol-3-carbonitrilo], pertenece a la familia de los fenilpirazoles. Fue descubierto y desarrollado por Rhone-Poulenc entre 1985 y 1987 y comercializado a mediados de los años 90 (Moffat, 1993). El espectro de acción abarca desde su uso como insecticida y acaricida de amplio espectro para la protección de cultivos y césped de distintos tipos de plagas, utilizándose también en algunos países como insecticida de uso doméstico, hasta medicamento de uso veterinario empleado en sanidad animal como antiparasitario de uso externo para la prevención y tratamiento de infestaciones por ectoparásitos. Es activo por ingestión y por contacto, siendo efectivo contra un gran número de insectos y ácaros (Colliot *et al.*, 1992).

### **1.1. SISTEMA AMINOACIDÉRGICO**

El sistema aminoacidérgico está constituido por el principal sistema inhibitorio representado por el GABA y la glicina y por los sistemas estimulantes representados por el glutamato y el aspartato.

En la actualidad, los aminoácidos reconocidos como neurotransmisores son cinco: el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y la taurina y los aminoácidos ácidos; ácido glutámico o glutamato, ácido aspártico o aspartato y la glutamina. Los dos primeros, que son aminoácidos neutros, tienen un efecto inhibitorio mientras que los tres siguientes son claramente excitatorios. El GABA y la taurina actúan sobre receptores asociados a canales iónicos, abren canales de  $\text{Cl}^-$ , producen una hiperpolarización de la membrana post sináptica y disminuyen la actividad neuronal. El glutamato, el aspartato y la glutamina están presentes en altas concentraciones en el Sistema Nervioso Central (SNC) y son liberados de forma dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  por estimulación eléctrica. También actúan sobre receptores asociados a canales iónicos, abren los canales de sodio, producen una despolarización de la membrana post sináptica y aumentan la actividad neuronal.

El sistema nervioso y el endocrino están interrelacionados, es decir las secreciones de las glándulas endocrinas están controladas por la acción directa o indirecta del sistema nervioso, los cuales desempeñan funciones de relieves en el comportamiento y conductas de los seres vivos. El sistema neuroendocrino se ocupa de coordinar todas las partes del organismo para recibir las múltiples señales que llegan continuamente, procesarlas y responder a ellas. Aunque están íntimamente relacionados, dichos sistemas funcionan de manera diferente. Mientras el sistema nervioso responde a los estímulos mediante señales eléctricas a través de las neuronas, el sistema endocrino envía señales químicas, llamadas hormonas, vía circulación sistémica.

La hipófisis o glándula hipofisaria es el órgano neuroendocrino principal. Su actividad está regulada por el hipotálamo. De hecho, las neuronas hipotalámicas envían sus axones a la eminencia media, donde liberan, en los vasos del sistema portal hipotalámico-hipofisario, factores reguladores de la secreción hormonal. Estos neuromoduladores, al llegar a la hipófisis, regulan la síntesis y secreción de las distintas hormonas hipofisarias. Además, el SNC no está involucrado sólo en el control de la hipófisis, sino que su propia función es regulada por las hormonas secretadas por esta glándula.



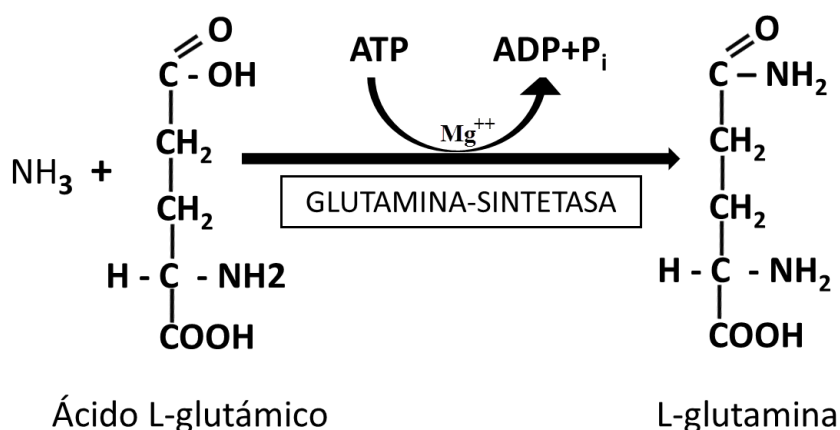
### 1.1.1. AMINOÁCIDOS TRANSMISORES

#### GLUTAMINA

La glutamina (abreviada Gln o Q) es una cadena lateral de una amida del ácido glutámico, formada mediante el reemplazo del hidroxilo del ácido glutámico con un grupo funcional amina. Es el aminoácido más abundante en los músculos humanos (llegando a casi el 60% de los aminoácidos presentes) y está muy relacionado con el metabolismo que se realiza en el cerebro. Se trata de un aminoácido “no esencial” por la capacidad que poseen muchas células del organismo para sintetizarlo a partir de grupos amino presentes en los alimentos, aunque ha sido reclasificada como “condicionalmente esencial” durante la última década, debido a que se produce usualmente en cantidades adecuadas por síntesis endógena pero bajo determinadas circunstancias se requiere de forma exógena, ya que su demanda fisiológica normalmente excede a la capacidad celular para sintetizarla endógenamente durante períodos de enfermedad (Fuchs y Bode, 2006).

La glutamina tiene funciones metabólicas específicas e importantes. Es el aminoácido libre más abundante en la circulación y en los espacios intracelulares, además de ser precursor de la síntesis de aminoácidos, nucleótidos, ácidos nucleicos, azúcares aminados, proteínas y muchas otras moléculas biológicamente importantes (Smith, 1990) por lo que es esencial para el metabolismo celular (Bode, 2001). La concentración intracelular de glutamina es del orden de 2-20 mM (Newsholme *et al.*, 2003a) mientras que en el medio extracelular su concentración es aproximadamente de 0,7 mM (Newsholme *et al.*, 2003b). El metabolismo intracelular de este aminoácido es muy rápido (Darmaun *et al.*, 1986). La división bioquímica del metabolismo de la glutamina refleja una compartimentación intracelular, pues la síntesis de purina, pirimidina y de azúcares aminados ocurre en el citoplasma, mientras el metabolismo del esqueleto de carbono de la glutamina se inicia por su desaminación por la glutaminasa dependiente de fosfato en la mitocondria (Curthoys y Watford, 1995).

Tanto la glutamina como el glutamato están fuertemente compartimentalizados (en neuronas para el caso del glutamato y en astrocitos para el caso de la glutamina) y están directamente conectados con el metabolismo energético y la neurotransmisión (Escartín *et al.*, 2006). Participa en el ciclo metabólico del glutamato y del GABA. De hecho, el glutamato secretado desde los axones terminales es captado por dos transportadores gliales de glutamato (EAAT1 o GLAST y EAAT2 o GLT-1) (Danbolt, 2001) mientras que la metabolización del glutamato en glutamina queda bajo control de una enzima astrocítica específica, la glutamina sintetasa (GS) (Figura 1).



**Figura 1. Metabolismo del glutamato vía enzima glutamina sintetasa.**

La glutamina es entonces transportada de vuelta a las neuronas a través de transportadores aminoacídicos (Mackenzie y Erickson, 2004) para ser después transformada en glutamato por la glutaminasa activada por fosfato (PAG), localizada en la membrana interna mitocondrial (Laake *et al.*, 1999; Walls *et al.*, 2010) y finalmente empaquetada en vesículas por los transportadores vesiculares de glutamato (Fremeau *et al.*, 2004; Escartín *et al.*, 2006). Al mismo tiempo, el glutamato puede ser también descarboxilado por la glutamato descarboxilasa (GAD) dando lugar al GABA en el citosol, referido como síntesis directa de GABA (Bradford *et al.*, 1983). Aunque la síntesis de GABA se limita al compartimento neuronal, la glutamina está considerada como el precursor principal de la síntesis de glutamato y GABA en el astrocito (Bradford *et al.*, 1978; Battaglioli y Martin, 1991; Sonnewald *et al.*, 1993; Waagepetersen *et al.*, 2001). Este ciclo reúne las dos condiciones para que se produzca la neurotransmisión glutamatérgica: una rápida

eliminación del glutamato secretado en la hendidura sináptica y la recaptación del glutamato en neuronas en forma de su inmediato precursor, la glutamina (Zwingmann y Butterworth, 2005).

La glutamina es importante en la gluconeogénesis, síntesis de urea, homeostasis del pH, neurotransmisión y en la diferenciación y crecimiento celular. Además, es el principal sustrato energético de células de proliferación rápida, como enterocitos intestinales y linfocitos activados (Cynober, 1999; Andrews y Griffiths, 2002), aumenta la respuesta linfocítica a la estimulación de mitógenos (Taudou *et al.*, 1983) y alivia la bacteriemia y la endotoxemia (O'Dwyer *et al.*, 1987; Yi y Allee, 2002).

Por tanto, en el cerebro, el ciclo de glutamina-glutamato entre astrocitos y neuronas es esencial para la homeostasis de glutamina y para la generación y reciclaje de neurotransmisores (Schousboe, 2003). El ciclo intercelular de la glutamina entre los hepatocitos periportales y perivenosos es importante para la regulación de ciclo de la urea en el hígado con consecuencias para la desintoxicación del amoníaco y la regulación del pH sistémico (Häussinger y Schliess, 2007). La glutamina es también un sustrato esencial para algunas células clave del sistema inmune, tales como macrófagos y linfocitos (Curi *et al.*, 1999; Castell *et al.*, 2004). Además de la regulación de estas funciones orgánicas encontramos otros órganos, tejidos y células en los que este aminoácido es parte importante. Entre las funciones orgánicas que regula la glutamina podemos citar los siguientes: intestino (Ramos y cols., 2002), riñón (Conjard *et al.*, 2002), corazón (Khogali *et al.*, 2002), neuronas (Mates *et al.*, 2002), neutrófilos (Pithon-Curi *et al.*, 2003), células  $\beta$ -pancreáticas (Malaisse *et al.*, 1980) y tejido adiposo (Kowalchuk *et al.*, 1988). Bajo ciertas condiciones es una fuente de energía para células y tejidos (Curi *et al.*, 2005).

Indirectamente, la glutamina tiene un papel protector frente al estrés oxidativo celular (Mates *et al.*, 2002), ya que el tripéptido glutation (GSH), constituido por glutamato, glicina, y cisteína, participa activamente en esta función protectora, y la glutamina es esencial en la síntesis de glutamato. Además, tiene cierta capacidad antiapoptótica (Petronini *et al.*, 1996), posiblemente

relacionada con la supervivencia de las células linfoides, de enterocitos y de células cancerosas (Fuchs y Bode, 2006). Cabe destacar su acción a nivel inmunológico (Melis *et al.*, 2004), ya que este aminoácido se requiere para eventos tardíos de activación de las células T, para la progresión del ciclo celular de los linfocitos (Horig *et al.*, 1993) y protege a los linfocitos T humanos frente a la apoptosis (Chang *et al.*, 2002).

### GLUTAMATO Y ASPARTATO

Los aminoácidos L-glutamato y L-aspartato, son los neurotransmisores excitadores más abundantes del SNC, siendo el glutamato el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central de los mamíferos, puesto que es usado en aproximadamente dos tercios de las sinapsis (Meldrum, 2000; Francis, 2003). Ambos se sintetizan intracerebralmente ya que ningún aminoácido puede atravesar la barrera hematoencefálica.

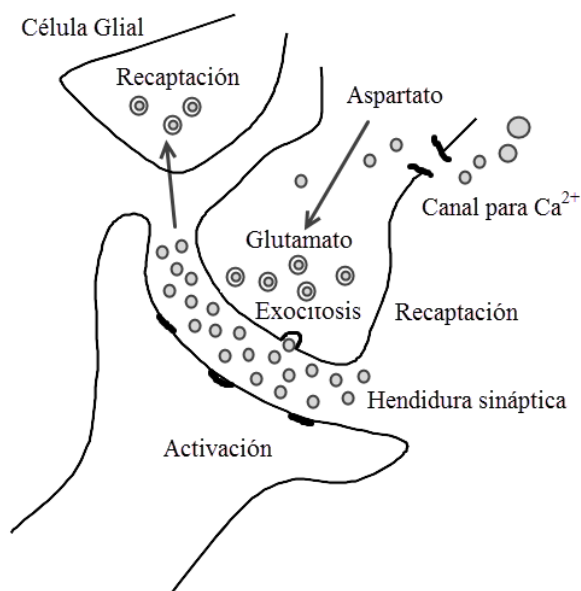
El aspartato es un aminoácido endógeno presente en tejido nervioso y endocrino de vertebrados e invertebrados (D'Aniello *et al.*, 2000), así como en la glándula pineal (Schell *et al.*, 1997). En los órganos del eje hipotalámico-hipofisario-testicular está en concentraciones elevadas (D'Aniello *et al.*, 1996), regulando la actividad del sistema reproductor (D'Aniello *et al.*, 2000).

En condiciones de reposo, la concentración de glutamato en el espacio extracelular es de 1  $\mu$ M, en el citoplasma presináptico es de 10 mM y en las vesículas de almacenamiento es de 100 mM. El gradiente entre el espacio extracelular y el citoplasma presináptico es sostenido por un mecanismo sodio dependiente. El gradiente entre las vesículas de almacenamiento y el citoplasma celular depende de una bomba ATPasa (Figura 2).

En el cerebro, el glutamato proviene de dos fuentes principales: desde la glucosa a través del ciclo de Krebs y transaminación de  $\alpha$ -cetoglutarato y desde la glutamina que es tomada desde el espacio sináptico, tanto por neuronas como astrocitos (Barnes y Slevin, 2003). El  $\alpha$ -

cetoglutarato es aminado a partir del aspartato, para convertirse en glutamato. Así mismo el esqueleto carbonado del aspartato, una vez desaminado, es convertido en oxalacetato, también intermediario del ciclo de Krebs. El glutamato obtenido por cualquiera de estas vías es introducido en vesículas sinápticas, las cuales serán liberadas al espacio intercelular. El glutamato no ligado es recaptado tanto por la neurona presináptica como por las células de la glía, gracias a transportadores de membrana (Von Bohlen y Dermietzel, 2002a). En las células gliales, el glutamato es metabolizado a glutamina mediante la glutamina sintetasa.

El aspartato es así mismo formado por una transaminasa en la que el oxalacetato es aminado por transaminación del grupo amino del glutamato (que es otra forma de degradación del glutamato). El esqueleto carbonado del glutamato se convierte en  $\alpha$ -cetoglutarato. Además el glutamato, mediante descarboxilación, da lugar al GABA, reacción catalizada por la glutamato descarboxilasa (GAD).



**Figura 2. Secuencia de liberación y recaptación del glutamato y aspartato en las hendiduras sinápticas.**

Las neuronas glutamatérgicas son particularmente abundantes en la corteza cerebral, desde donde se proyectan hacia diversas estructuras subcorticales como hipocampo, complejo

basolateral de la amígdala, sustancia negra, núcleo accumbens, núcleo caudado, el núcleo rojo y la médula-puente. (Von Bohlen y Dermietzel, 2002a). También se han descrito vías glutamatérgicas intrínsecas en el hipocampo así como proyecciones glutamatérgicas que van desde la formación hipocampal hacia el hipotálamo, el núcleo accumbens y el septum lateral (Von Bohlen y Dermietzel, 2002a).

Hay varios tipos de moléculas transportadoras de glutamato (VGLUT1, VGLUT2 y VGLUT3) involucradas en la captación del aminoácido hacia el interior de las vesículas de almacenamiento (Gras *et al.*, 2002), hecho importante en la regulación de la actividad glutamatérgica (Hertz, 2006). Además, el glutamato también es secretado por los astrocitos. De hecho, estas células contienen vesículas de almacenamiento y transportadores vesiculares de glutamato (Kang *et al.*, 2005).

El glutamato actúa tanto a través de receptores acoplados a canales iónicos (receptores ionotrópicos) como a receptores acoplados a proteínas G (receptores metabotrópicos) (Michaelis, 1998). En los primeros la unión del glutamato a su receptor resulta en un cambio conformacional que permite el paso de cationes de calcio y sodio a través de un poro. Los receptores metabotrópicos, por otro lado, no son permeables a iones, al contrario, estos receptores están acoplados por medio de proteínas G a segundos mensajeros intracelulares, los cuales pueden regular actividades celulares como transcripción de genes, pero también fosforilación de canales iónicos dependientes de voltaje o dependientes de ligandos (Simeone *et al.*, 2004). Cada uno de estos grupos tiene aún más diversidad molecular, lo cual resulta en la existencia de diferentes subunidades o subtipos (Tabla 1) (Bleich *et al.*, 2003; Garattini, 2000).

Los canales formados por los receptores ionotrópicos AMPA y el KA son primariamente permeables a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Ambos intervienen en la transmisión sináptica rápida del SNC, mientras que los receptores NMDA median la transmisión sináptica excitatoria lenta. Estos últimos están acoplados a canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , y para ser activados por el glutamato, la neurona postsináptica debe

estar fuertemente despolarizada. Cuando este canal iónico se abre, el  $\text{Ca}^{2+}$  entra en la célula y activa distintos procesos intracelulares que conducen a la fosforilación de kinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (Bliss y Collingridge, 1993).

Clasificación de receptores de glutamato
<b>Receptores ionotrópicos</b>
Familia de receptores NMDA (entrada de $\text{Ca}^{2+}$ ) NR1 NR2A-D
Familia de receptores AMPA (entrada de $\text{Na}^{+}$ ) GluR1-4
Familia de receptores de Kainato (entrada de $\text{K}^{+}$ ) GluR5-7 KA1-2
<b>Receptores metabotrópicos</b>
Grupo I (Activación de Fosfolipasa C) mGluR1 mGluR5
Grupo II (Inhibición de Adenilciclasa) mGluR2 mGluR3
Grupo III (Inhibición de Adenilciclasa) mGluR4 mGluR6-8

**Tabla 1. Clasificación de los diferentes receptores de glutamato.** NMDA: N-metil-D-aspartato; AMPA: a-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-ácido propiónico.

Los receptores metabotrópicos comprenden una familia heterogénea de receptores que están vinculados a varias vías de señales de transducción vía proteínas G. A diferencia de los receptores ionotrópicos, la unión de glutamato a receptores metabotrópicos, no activa la apertura de un canal intrínseco sino que regula la transmisión sináptica y excitabilidad neuronal a través de la activación o inhibición de varios sistemas efectores acoplados a proteínas G. Por esta razón, los efectos de la activación de esta clase de receptores son considerablemente más lentos al inicio y su duración de acción es mayor, por lo cual pueden modular la actividad neuronal a través de un mayor período de tiempo (Simeone *et al.*, 2004). La estructura de estos receptores es la típica estructura de los receptores acoplados a proteína G, y consta de siete dominios transmembrana,

separados por pequeñas asas intra y extracelulares. Se denominan mGluR, y hasta la fecha se han descrito 8 subtipos, divididos en tres grupos. El grupo I, lleva a la activación de la Fosfolipasa C, resultando en la generación de dos segundos mensajeros: el DAG (diacilglicerol) que activa a la proteína kinasa C, y el inositol-3-fosfato, que media la liberación de iones de calcio de los depósitos intracelulares. Este mecanismo lleva a la excitación neuronal, y a su vez, esto produce un feedback positivo que puede llevar a sobreexcitación causando posible muerte celular por apoptosis. Esto se ha denominado "excitotoxicidad". En contraste, la activación de los grupos II y III, cuya activación a su vez inhibe a la adenilciclase, resulta en una menor producción de AMPc y en una menor liberación de glutamato, siendo entonces neuroprotectivos (Bleich *et al.*, 2003; Simeone *et al.*, 2004).

Como se ha visto, el mecanismo principal que parece mediar la neurotoxicidad aguda es el desequilibrio iónico relacionado con la entrada excesiva de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , a través de canales iónicos. La excitotoxicidad de los receptores de glutamato se ha demostrado como un mecanismo fisiopatológico en el desarrollo de neurodegeneración tras traumatismos, isquemia y otras enfermedades neurológicas (Kemp y Mckernan, 2002). Debido a que los receptores glutamatérgicos son canales iónicos selectivos a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , cualquier estimulación sostenida resulta en daño osmótico debido a la entrada excesiva de iones y agua. Los receptores NMDA tienen una participación particularmente importante al conducir iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , que son cruciales determinantes del daño (Bleich *et al.*, 2003). Es esta alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  la que activa a varias cascadas enzimáticas que incluyen, entre otras, a las fosfolipasas. Tras la activación de la fosfolipasa  $\text{A}_2$ , se genera ácido araquidónico el cual potencia las corrientes evocadas por NMDA e inhibe la reabsorción de glutamato por astrocitos y neuronas. La consecuencia es mayor con el glutamato extracelular, pues contribuye a una activación sostenida de los receptores glutamatérgicos (Gill y Pulido, 2001; Julio-Pieper *et al.*, 2011).



Además de estar involucrado el glutamato en la plasticidad sináptica en el adulto, la neurogénesis y neurodegeneración (Bleich *et al.*, 2003; Simeone *et al.*, 2004), la disfunción de las vías glutamatérgicas ha sido relacionada con diversas enfermedades degenerativas: Alzheimer (Sze *et al.*, 2001), esquizofrenia (Trudeau, 2004), esclerosis lateral amiotrófica (Trotti *et al.*, 2001) y Parkinson (Jonkers *et al.*, 2002).

### **GABA**

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central. El GABA está presente en el cerebelo en grandes concentraciones, donde las células de Purkinje que recogen las principales aferencias desde el bulbo actúan liberando GABA al tálamo e hipotálamo, núcleos grises basales y al córtex cerebral. De igual forma se encuentra presente en la sustancia negra, la cual contiene gran cantidad de neuronas dopaminérgicas (Von Bohlen y Dermietzel, 2002a).

La biosíntesis de GABA ocurre en las neuronas, pues este neurotransmisor no puede penetrar la barrera hematoencefálica. La síntesis de GABA se produce por descarboxilación del glutamato, y es catalizada por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), de la cual se han identificado dos isoformas, GAD65 y GAD67. Este sistema enzimático es dependiente del fosfato de piridoxal, exclusivo de los mamíferos y se encuentra sólo en el sistema nervioso (Von Bohlen y Dermietzel, 2002a). Estas isoformas están codificadas por diferentes genes y difieren en cuanto a la regulación y localización intracelular (Erlander *et al.*, 1991; Kaufman *et al.*, 1991; Esclapez *et al.*, 1994). El GABA puede ser reciclado mediante una reacción de transaminación con  $\alpha$ -cetoglutarato, que da lugar a glutamato, el cual puede ser utilizado para sintetizar GABA nuevamente. Esta reacción es catalizada por la enzima GABA transaminasa (GABA-T) la cual también tiene también al fosfato de piridoxal como coenzima. La GABA-T junto con la GAD y la succinato semialdehído deshidrogenasa (SSADH) se acoplan al ciclo de Krebs reemplazando las reacciones catalizadas por la 2-oxoglutarato deshidrogenasa y la succinil-CoA. Esta vía

alternativa se llama el “GABA-shunt” del ciclo de Krebs y en comparación con el ciclo normal, genera una cantidad menor de ATP.

Alteraciones en los circuitos GABAérgicos están asociados con un gran número de patologías psiquiátricas y neurodegenerativas, como por ejemplo, la Corea de Huntington, la enfermedad de Parkinson, la demencia senil, la enfermedad de Alzheimer y la esquizofrenia (Sonnevald y Kondziella, 2003).

### **Ciclo GABA-Glutamato-Glutamina**

El GABA sintetizado es almacenado en vesículas y liberado a la hendidura sináptica mediante exocitosis. Después de su liberación, es retomado por la terminal presináptica mediante un transportador y empacado otra vez en vesículas para su uso posterior. Otra parte del GABA es tomado por células de la glía para convertirlo en glutamato por la GABA-T y este a su vez ser convertido en la glutamina que es transportada al terminal nervioso donde será transformada en glutamato y posteriormente en GABA.

El GABA es transferido de las neuronas GABAérgicas a los astrocitos adyacentes en los cuales es transaminado, utilizando 2-oxoglutarato, para producir succinato-semialdehído y glutamato. Este último es convertido en glutamina mediante la glutamina sintetasa, y la glutamina generada es llevada de vuelta a la neurona GABAérgica donde es hidrolizada por la PAG para producir el glutamato que es descarboxilado para formar GABA y cerrar el ciclo. Dicho ciclo se representa en la Figura 3.



- Actúa como neurotransmisor (Okamoto *et al.*, 1982)

- la actividad cardiovascular (Pion *et al.*, 1987),
  - la actividad del sistema endocrino y del inmunitario (Sturman, 1993),
  - la presión arterial (Meeley *et al.*, 1989).
- Es un compuesto neuroprotector (Saransaari y Oja, 2000):
  - Protege a las neuronas de la excitotoxicidad inducida por aminoácidos excitadores, como el glutamato, mediante la reducción del nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  libre (El Idrissi y Trenkner, 1999; Chen *et al.*, 2001), puesto que previene la despolarización de la membrana inducida por dicho glutamato, probablemente a través de su efecto sobre la apertura de los canales de  $\text{Cl}^-$  (Oja *et al.*, 1990) evitando así el aumento en la entrada de calcio y otros eventos posteriores inducidos por el glutamato (Wu *et al.*, 2005).
  - Previene el daño metabólico derivado de la isquemia e hipoxia (Schurr *et al.*, 1987).
- Está involucrada en la osmorregulación.
- Posee capacidad antioxidante (Aruoma *et al.*, 1988; Green *et al.*, 1991), al neutralizar radicales superóxido y otras especies reactivas del oxígeno, y prevenir el daño celular causado por los radicales libres (Ebrahim y Sakthisekaran, 1997), como son los cambios en la permeabilidad de membrana (Neal *et al.*, 1999). Además, la hipotaurina (metabolito intermediario en la síntesis de la taurina) es un agente antioxidante y “scavenger” de radicales libres (Aruoma *et al.*, 1988): mitiga los efectos de los oxidantes secretados por los neutrófilos humanos (Green *et al.*, 1991), inhibe la peroxidación lipídica (Tadolini *et al.*, 1995) y previene la inactivación de la superoxido dismutasa por el peróxido de hidrógeno (Pecci *et al.*, 2000). También protege el tracto reproductor masculino frente al daño oxidativo (Holmes *et al.*, 1992).
- Tiene un papel en el establecimiento del equilibrio entre los procesos de excitación e inhibición en el cerebro (Maciejak *et al.*, 2009). Interactúa preferentemente con los

receptores GABA<sub>A</sub> del cerebro, como un análogo estructural del principal transmisor inhibitorio, el GABA (Malminen y Kontro, 1986), pero de forma menos efectiva que este en sí mismo (Del Olmo *et al.*, 2000; Frosini *et al.*, 2003). De los diferentes receptores GABA<sub>A</sub>, la taurina actúa como el agonista más fuerte en aquellos que contienen la subunidad  $\beta 2$ , la cual es más abundante en el giro dentado del hipocampo de los mamíferos, la sustancia negra, la capa molecular del cerebelo, el núcleo talámico medial y la región CA3 del hipocampo (Bureau y Olsen, 1991). La taurina también puede unirse a los receptores GABA<sub>B</sub>, aunque existe menor afinidad por ellos en el cerebro adulto (Saransaari y Oja, 2008).

La principal vía para la biosíntesis de la taurina, es a partir de metionina y cisteína a través de la ácido-cisteín-sulfínico-descarboxilasa (CSD), y normalmente requiere la oxidación de hipotaurina a taurina como el paso final. Esta última reacción está catalizada por la hipotaurina deshidrogenasa (Stipanuk, 1986).

La taurina, tras ser sintetizada, es secretada a la hendidura sináptica por transportadores dependientes de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (Saransaari y Oja, 2006). Esta secreción es modulada por segundos mensajeros (AMP<sub>c</sub>) y por fosfolipasas (Saransaari y Oja, 2006) y se lleva a cabo por un mecanismo que precisa la entrada de Ca<sup>2+</sup>, o bien por otro no dependiente de este ión (Saransaari y Oja, 1992). Por otro lado, la liberación de taurina está fuertemente estimulada por ella misma y por análogos estructurales del GABA (Saransaari y Oja, 1992), ya que la taurina puede interactuar con transportadores de GABA (Palacin *et al.*, 1998).

La taurina es uno de los aminoácidos más abundantes en el cerebro y la médula espinal, en los leucocitos, en las células cardíacas y musculares, en la retina, y en casi todos los tejidos del organismo corporal (Ripps y Shen, 2012). Existe una evidencia creciente de que la depleción de taurina conduce a una amplia variedad de patologías, incluyendo cardiomiopatía severa (Zulli,

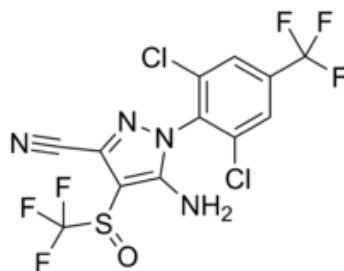
2011), disfunción renal (Yamori *et al.*, 2010), disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas (L'Amoreaux *et al.*, 2010), pérdida de fotorreceptores en la retina (Schmidt *et al.*, 1976), diabetes Tipo 1 y Tipo 2 (Ito *et al.*, 2012), ciertos tipos de epilepsia (Gupta *et al.*, 2005) y retrasos en la diferenciación y migración celular en el cerebelo, células piramidales y la corteza visual (Maar *et al.*, 1995).

## **1.2. TOXICOLOGÍA DEL FIPRONIL**

### **1.2.1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL FIPRONIL**

El fipronil es un insecticida de amplio espectro de la familia de los fenilpirazoles. Su estructura molecular (IUPAC) corresponde con 5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-trifluorometilsulfinil-1H-pirazol-3-carbonitrilo y su número de identificación o número CAS (Chemical Abstracts Service) es 120068-37-3. Se le conoce por gran multitud de sinónimos, siendo el del código MB 46030 el que inicialmente se le dio en la planta Rhône-Poulenc Biochimie, en Saint-Aubin-Lès-Elbeuf, Francia, actualmente Bayer CropScience (Simon Delso *et al.*, 2015). Se trata de un sólido pulverulento cristalino de color amarillento y con olor a moho cuya fórmula química es  $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$  y con la estructura química que se muestra en la Figura 4.

En pequeñas cantidades es soluble en agua, estable a temperaturas habituales durante un año, pero no es estable en presencia de iones metálicos (USEPA, 1996a). El fipronil posee un peso molecular de 437,15 y unas propiedades fisicoquímicas que se detallan en la Tabla 2. Se degrada por acción de la luz dando una serie de metabolitos, principalmente el derivado que no contiene el grupo sulfinilo (MB 46513), conocido como destiofipronil o fipronil-desulfinil, el cual es extremadamente estable y también más tóxico que el compuesto original. La Tabla 3 se especifica la solubilidad del fipronil en distintos tipos de disolventes.



**Figura 4. Estructura química del fipronil.**

<b>Punto de fusión</b>	200-201 °C
<b>Densidad</b>	1.477 a 1.626 g/mL (20°C)
<b>Presión de vapor</b>	2,8 x 10 <sup>-9</sup> mm Hg (25°C)
<b>Su solubilidad en agua (a 20 °C)</b>	1.9 mg/L a pH 7
<b>Presión de vapor</b>	1.9 mg/L a pH 5
<b>Logaritmo decimal del coeficiente de partición octanol-agua (log POW)</b>	2.4 mg/L a pH 9

**Tabla 2. Principales propiedades físico-químicas del fipronil.** (USEPA, 1996a).

Este compuesto prácticamente no se volatiliza, por ello es muy poco probable encontrarlo en el aire, excepto cuando se aplica como spray. En esos casos se presenta en forma de partículas que se depositan con la lluvia y el polvo. Muestra una afinidad baja a moderada por el suelo, dependiendo de su tipo y contenido de materia orgánica. La hidrólisis de este compuesto, mediada por la acción de los microorganismos y en una pequeña proporción por reacciones químicas, participa de manera importante en la eliminación de este compuesto en los suelos. Asimismo, la fotólisis contribuye en cierta medida en este proceso. Su vida media en suelo varía de 18 a más de 300 días en el suelo, dependiendo del tipo, contenido de carbono orgánico y pH. En el agua es removido por fotólisis, biodegradación (aerobia y anaerobia) y adsorción a sólidos suspendidos y sedimentos. Su potencial estimado de bioconcentración en los organismos acuáticos es alto.

Disolvente	Solubilidad (g/L)
Agua (pH 5)	0,0024
Agua (pH 7)	0,003
Agua (pH 9)	0,0022
Acetona	545,9
2-Propanol	36,2
Diclorometano	22,3
Acetato de etilo	264,9
Hexano	0,028
Metanol	137,5
Tolueno	3,0
1-Octanol	12,2

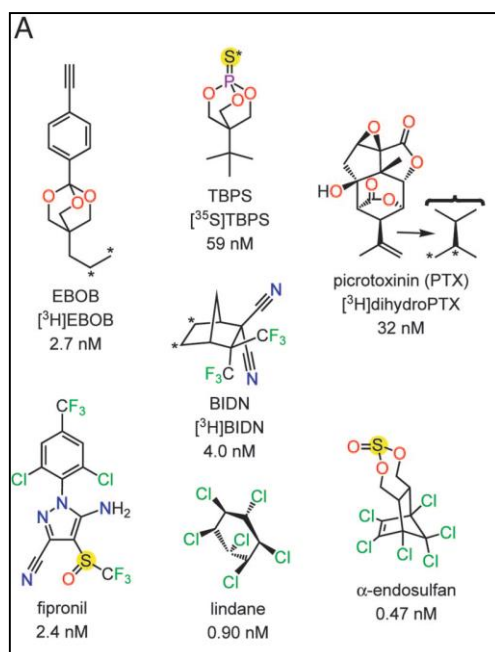
**Tabla 3. Solubilidad del fipronil en distintos disolventes.** (USEPA, 1996a; JMPR, 2002).

## 1.2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DEL FIPRONIL

### 1.2.2.1. Acción del fipronil sobre el sistema gabaérgico

El control de las plagas de insectos en los últimos 60 años se ha logrado, en parte, mediante la aplicación de insecticidas policlorocicloalcanos, entre los que se encuentran los ciclodienos (por ejemplo, endosulfán y dieldrin), el lindano y sus isómeros, y otros; en la actualidad muchos de ellos están altamente restringidos o prohibidos. Uno de los compuestos de reemplazo es el fenilpirazol fipronil. Todos estos insecticidas junto con el veneno botánico picrotoxina (PTX) tienen muy diversas estructuras químicas, pero parecen actuar por un mecanismo similar. El canal de  $\text{Cl}^-$  regulado por receptores GABA es la diana de los insecticidas y tóxicos mencionados anteriormente. Las estructuras químicas de la primera generación de insecticidas que actúan como ligandos bloqueando los canales de  $\text{Cl}^-$  asociados a los receptores GABAérgicos se representan en la Figura 5. Todos estos compuestos actúan en mamíferos e insectos como antagonistas no competitivos para bloquear el flujo de  $\text{Cl}^-$  de forma que el objetivo de todos ellos es el sitio de unión al receptor GABA (Chen *et al.*, 2006).





**Figura 5. Estructura química de la picrotoxina (PTX) y los principales policlorocicloalcanos y trioxabicyclo-octanos que actúan bloqueando los canales de  $\text{Cl}^-$  asociados a receptores GABAérgicos en insectos.** BIDN: 3,3-bis-(trifluorometil)-bicyclo[2.2.1.]heptano-2,2-dicarbonitrilo; TBPS: biciclofosforotionato de 4-*t*-butilo; TBOB: bicyclo-o-benzoato de *t*-butilo; EBOB: 1-[(4-etinil)fenil]-4-*n*-propil-2,6,7-trioxabicyclo[2.2.2]octano

Antes de descubrirse la actividad insecticida y acaricida del fipronil, el grupo de los fenilpirazoles era conocido por la actividad herbicida que presentaban algunas moléculas (Cole *et al.*, 1993), mediante una acción inhibitoria de la protoporfirinógeno IX oxidasa (Yanase y Andoh, 1989). Inicialmente se pensó que el fipronil actuaba inhibiendo la acetilcolinesterasa, haciendo así que la acetilcolina se acumulase a nivel de las terminaciones nerviosas causando hiperexcitabilidad en insectos y ácaros (Massol y Antollini, 2000) y no fue hasta 1993 cuando Cole *et al.* (1993) describieron la acción del fipronil sobre los receptores GABAérgicos asociados a canales de  $\text{Cl}^-$ . Una de las razones de la popularidad del fipronil, es que exhibe un alto grado de selectividad por los receptores de las células nerviosas de insectos en relación a los de mamíferos, aumentando el umbral de seguridad para personas y animales (Hainzl *et al.*, 1998; Matsuda *et al.*, 2001). El fipronil no presenta actividad herbicida y constituye el primer representante de una segunda generación de insecticidas que actúan sobre los receptores GABAérgicos ionotrópicos de los insectos y ácaros, equivalentes a los receptores tipo  $\text{GABA}_A$  y  $\text{GABA}_C$  de mamíferos, provocando un bloqueo de canales de  $\text{Cl}^-$  asociados a estos receptores (Colliot *et al.*, 1992; Cole

*et al.*, 1993; Buckingham *et al.*, 1994; Bloomquist, 1996; Ratra y Casida, 2001; Ratra *et al.*, 2001, 2002; Tingle *et al.*, 2003; Szegedi *et al.*, 2005). Dado que el GABA tiene actividad inhibitoria en el sistema nervioso central al actuar evitando la estimulación neuronal excesiva, el bloqueo de receptores GABAérgicos inducido por el fipronil producirá una hiperexcitación neuronal en los insectos y ácaros a bajas dosis y parálisis y finalmente la muerte, a dosis elevadas (Szegedi *et al.*, 2005).

### **1.2.2.1.1. GABA y los receptores GABAérgicos asociados a canales de Cl<sup>-</sup> en mamíferos**

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es un aminoácido que, como se ha visto anteriormente, constituye el principal neurotransmisor con acción inhibitoria en el sistema nervioso central (SNC). El GABA fue descubierto en 1883, pero no fue hasta los años 50 cuando se describió su actividad inhibitoria (Bazemore *et al.*, 1956).

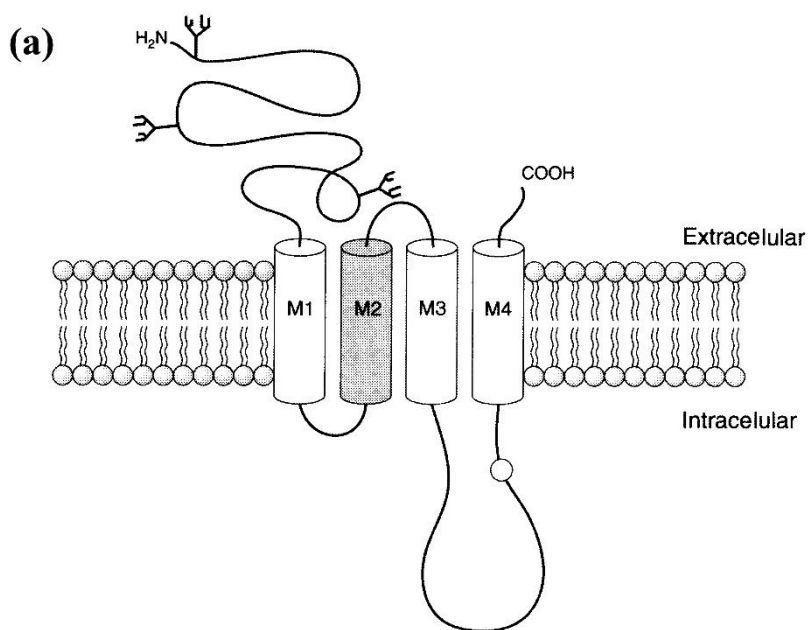
La acción inhibitoria del GABA puede ser presináptica o postsináptica. En el caso de varias neuronas inhibitorias en serie también se puede dar una desinhibición. La inhibición postsináptica se produce por la apertura de canales de Cl<sup>-</sup> en la membrana postsináptica, provocando la entrada de Cl<sup>-</sup> y la hiperpolarización de la neurona. La inhibición presináptica se da sobre todo en las neuronas sensoriales primarias por activación de receptores GABA<sub>A</sub> axónicos que provocan despolarización. En este caso el Cl<sup>-</sup> sale de la neurona, en vez de entrar, reduciéndose la entrada de iones calcio (Ca<sup>2+</sup>) y, por tanto, disminuyendo la liberación del neurotransmisor.

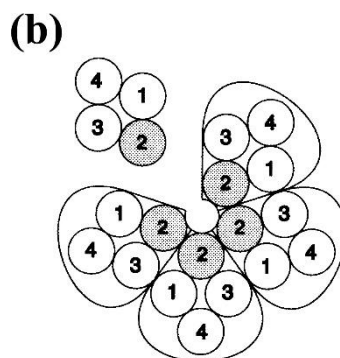
Junto con los receptores nicotínicos de la acetilcolina y los receptores de glicina, los receptores GABA pertenecen a la superfamilia de canales iónicos dependientes de ligando (LGIC). Los miembros de la superfamilia LGIC tienen una estructura común en la que cinco subunidades forman un canal iónico. Comparten tanto la estructura como la secuencia primaria y

se cree que han evolucionado a partir de una subunidad de receptor ancestral común (Betz, 1990).

La estructura terciaria se representa en la Figura 6

Cada subunidad, de unos 50-60 kDa, se compone de un largo extremo extracelular amino-terminal de aproximadamente 200 aminoácidos, 4 segmentos transmembrana (TM), y un extremo extracelular carboxi-terminal corto. El extremo N-terminal contiene un bucle  $\beta$  formado por un puente disulfuro entre dos restos de cisteína conocido como Cys-loop. Los segmentos TM3 y TM4 están unidos por un gran bucle citosólico de longitud variable. Imágenes en 2D de estos canales cerrados y abiertos, sugieren que sólo el segmento TM2 es una  $\alpha$ -hélice, mientras que los otros tres segmentos son probablemente hojas- $\beta$  (Gorne-Tschelnokow, 1994). Las cinco  $\alpha$ -hélice del segmento TM2, una de cada subunidad, se pliegan en el centro de la membrana para formar la puerta del canal iónico (Macdonald y Olsen, 1994; Darlison *et al.*, 2005).





**Figura 6. Receptor GABAérgico ionotrópico asociado a canales de Cl<sup>-</sup>:** (a) Esquema de una subunidad y (b) ensamblaje de cinco subunidades para formar el canal de Cl<sup>-</sup> a través del segmento M2 de cada subunidad. Tomada de Farrant (2001).

Existen tres tipos de receptores GABA. Unos de acción rápida, los receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> asociados a canales de Cl<sup>-</sup>, y otros de acción lenta, los receptores metabotrópicos GABA<sub>B</sub>.

- GABA<sub>A</sub>: El receptor GABA<sub>A</sub> está formado por cinco subunidades agrupadas circularmente formando un canal para el Cl<sup>-</sup>. Rodeando al poro que constituye el canal de Cl<sup>-</sup> se observan áreas para la unión del GABA y de agonistas o antagonistas competitivos, como el alcohol, benzodiazepinas, barbitúricos, PTX y esteroides anestésicos. Se antagoniza de forma selectiva por el convulsivante alcaloide bicuculina y son insensibles a la activación por el análogo de GABA baclofen (Bormann y Feigenspan, 1995; Johnston, 1996a). En los receptores GABA<sub>A</sub> el muscimol es un agonista mientras que el 4,5,6,7-tetrahidroisoxazolo[5,4-c]piridín-3-ol (THIP) es un agonista parcial (Kusama *et al.*, 1993; Krosgaard-Larsen *et al.*, 1994). Dependiendo de la composición de sus subunidades, los receptores muestran diversas propiedades farmacológicas y electroquímicas. Recientes estudios inmunoquímicos han demostrado que las subunidades individuales tienen una amplia distribución a lo largo de todo el SNC, Sistema Nervioso Periférico (SNP) y en alguna fibra nerviosa desmielinizada (Von Bohlen y Dermietzel, 2002a). La expresión de diversas subunidades en la misma neurona sugiere la existencia de un amplio número de subtipos del receptor GABA<sub>A</sub>. Pueden

existir hasta 500 diferentes receptores GABA<sub>A</sub> en el cerebro. La unión del GABA a su receptor postsináptico ocasiona la apertura del canal de Cl<sup>-</sup>, produciéndose una hiperpolarización de la membrana celular, con una reducción del potencial de acción. El resultado neto es una estabilización de la neurona.

- GABA<sub>B</sub>: El receptor GABA<sub>B</sub> actúa sobre canales de Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup> a través de su acoplamiento a proteínas G y de sistemas de segundos mensajeros. Se localizan en neuronas y células de la glía; principalmente en cortex cerebral, tálamo, cerebelo y en el asta dorsal de la médula espinal. Se han identificado en el SNP, en fibras desmielinizadas y en algunas células musculares lisas (Von Bohlen y Dermietzel, 2002a).
- GABA<sub>C</sub>: El receptor GABA<sub>C</sub> ha sido el último de los receptores GABA en ser identificado y se encuentra en neuronas retinianas. Los receptores GABA<sub>C</sub> son homoligoméricos y tienen propiedades espaciales y funcionales diferentes de las de los receptores GABA<sub>A</sub>. En particular, son unas 10 veces más sensibles que los GABA<sub>A</sub> a los agonistas fisiológicos (Chebib y Johnston, 1999), muestran una conductancia baja y tiempos de apertura bastante largos. Muestran una alta selectividad para el Cl<sup>-</sup>. Estos receptores son insensibles tanto a la bicuculina como al baclofen, y a diferencia de lo ocurrido con los receptores GABA<sub>A</sub>, los receptores GABA<sub>C</sub> son insensibles a los barbitúricos y las benzodiazepinas (Bormann y Feigenspan, 1995; Johnston, 1996b). Estudios tempranos realizados por Johnston *et al.* (1975), mostraron que esta clase de receptor se activa selectivamente por el análogo de GABA cis-4-ácido aminocrotónico (CACA) (Johnston *et al.*, 1975; Bormann y Feigenspan, 1995; Johnston, 1996b) y por el ácido (±)-cis-2-(aminometil)-ciclopropano-1-carboxílico ((1*S*,2*R*)-(+)-CAMP) (Duke *et al.*, 1998), y se bloquean de forma selectiva por el ácido (1,2,5,6-tetrahidropiridín-4-il) metilfosfínico (TPMPA) (Murata *et al.*, 1996; Ragozzino *et al.*, 1996). Sin embargo, el trans-enantiomero TACA no muestra mucha preferencia por estos receptores (Bormann y Feigenspan, 1995; Johnston, 1996b). El muscimol es un agonista parcial en los receptores GABA<sub>C</sub> (Kusama *et al.*, 1993; Woodward *et al.*, 1993), mientras que el THIP es un antagonista (Woodward *et al.*, 1993). Los receptores GABA<sub>C</sub> se encuentran en

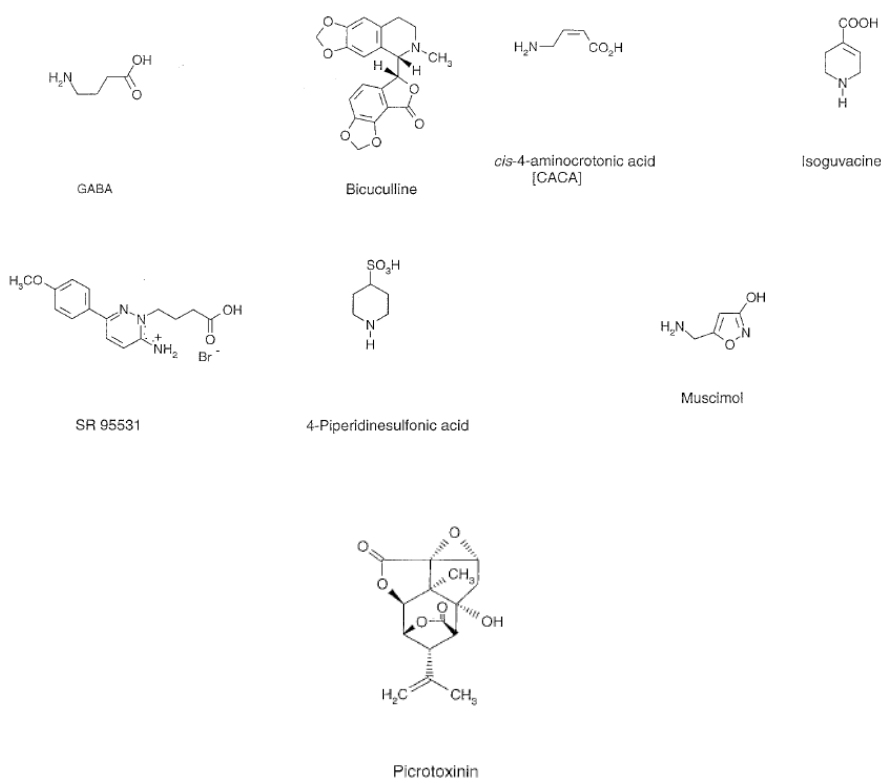
neuronas bipolares y horizontales de la retina y en el hipocampo (Von Bohlen y Dermietzel, 2002a).

El THIP puede ser útil para diferenciar los receptores GABA<sub>A</sub> de los GABA<sub>C</sub>. Ambos receptores son antagonizados por el TBPS y la PTX (Bowery *et al.*, 1976; Squires *et al.*, 1983; Shimada *et al.*, 1992), si bien Woodward *et al.* (1992) observaron que la PTX era 30 veces más débil sobre receptores GABA<sub>C</sub> (concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de 30 µM) que sobre receptores GABA<sub>A</sub> (CI<sub>50</sub> 1µM); y el TBPS era 250 veces más débil sobre receptores GABA<sub>C</sub> (CI<sub>50</sub> 50 µM) que sobre receptores GABA<sub>A</sub> (CI<sub>50</sub> 0,2 µM). En la Tabla 4, se indican las principales sustancias agonistas, antagonistas y moduladoras de los receptores GABAérgicos, así como la estructura química de algunas de estas sustancias en la Figura 7.

Receptor	Canal iónico	Segundo mensajero	Agonistas	Antagonistas	Moduladores
GABA <sub>A</sub>	Cl <sup>-</sup> (Asociado)		GABA muscimol, THIP	Bicuculina <sup>1,2</sup> , Gabacina (SR95531) <sup>1,2</sup> , PTX <sup>3</sup> ,TBPS <sup>3</sup>	Benzodiazepinas <sup>4</sup> , barbitúricos <sup>4,5</sup> , neuroesteroides <sup>4,5</sup> ,anestésicos <sup>4,5</sup> , etanol <sup>6</sup>
GABA <sub>B</sub>	Ca <sup>+2</sup> o K <sup>+</sup> (a través de proteína G <sub>O</sub> ) <sup>7</sup>	AMPC (a través de proteína G <sub>i</sub> ) <sup>8</sup>	GABA, baclofeno <sup>1</sup> , APPA <sup>1</sup>	CGP54626 <sup>1</sup>	
GABA <sub>C</sub>	Cl <sup>-</sup> (Asociado)		GABA, CACA <sup>1</sup> , CAMP <sup>1</sup> , muscimol	PTX, TBPS, THIP, TPMPA <sup>1</sup>	

**Tabla 4. Principales sustancias agonistas, antagonistas y moduladoras de los receptores GABAérgicos de mamíferos.** Modificada de Von Bohlen Und Halbach y Dermietzel (2002b). THIP: 4,5,6,7-tetrahidroisoxazolo[5,4-c]piridín-3-ol; PTX: picrotoxina; TBPS: biciclofosforotionato de 4-*t*-butilo; AMPc: monofosfato de adenosina cíclico; Baclofeno: ácido (R)-4-amino-3-(4-clorofenil)butanoico; APPA: ácido 3-amino-propil-fosfínico; CGP54626: ácido [S-(R,R)]-[3-[[1-(3,4-diclorofenil)etil]amino]-2-hidroxiopropil](ciclohexilmetil)fosfínico; CACA: ácido Z-4-aminobut-2-enoico (ácido cis-aminocrotónico); CAMP: ácido(±)-cis-2-(aminometil)-ciclopropano-1-carboxílico; TPMPA: ácido (1,2,5,6-tetrahidropiridín-4-il)metilfosfínico. <sup>1</sup> Selectivo; <sup>2</sup> Competitivo (actúan sobre el lugar de unión del GABA); <sup>3</sup> No competitivo; <sup>4</sup> Las benzodiazepinas, barbitúricos, neuroesteroides y anestésicos son moduladores alostéricos positivos, si bien algunos, como el metil-6,7-dimetoxi-4-etil-β-carbolín 3-carboxilato (DMCM), actúan como agonistas inversos y el flumazenilo como antagonista; <sup>5</sup> A dosis elevadas activan directamente canales de Cl<sup>-</sup>; <sup>6</sup> Se ha demostrado que el etanol posee efectos neurofarmacológicos mediados por receptores GABA<sub>A</sub>, si bien el lugar de unión al receptor no está claro (Korpi, 1994); <sup>7</sup> La proteína G<sub>O</sub> puede disminuir la entrada de Ca<sup>+2</sup>, disminuyendo la liberación del neurotransmisor, o aumentar la salida de K<sup>+</sup>, provocando la hiperpolarización de la neurona; <sup>8</sup> La proteína G<sub>i</sub> inhibe la adenilato ciclasa, disminuyendo la concentración intracelular de AMPc y disminuyendo la liberación de neurotransmisor.

## INTRODUCCIÓN

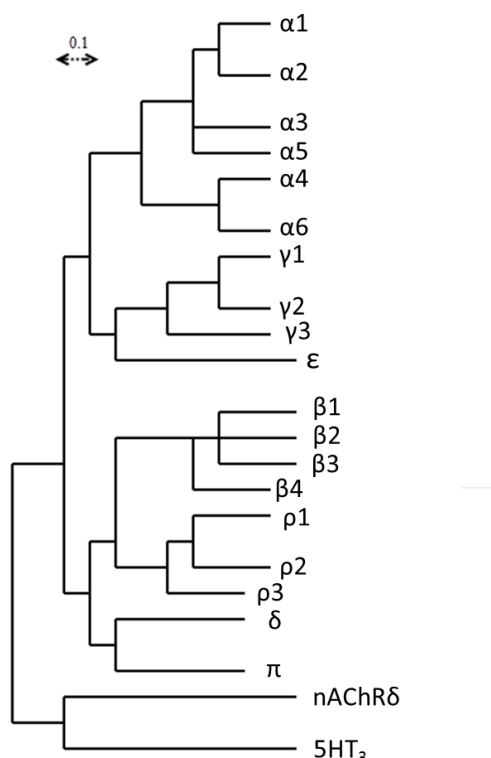


**Figura 7. Estructura química de alguna de las sustancias que actúan como agonista o antagonistas del receptor GABA.**

Los receptores GABA<sub>A</sub> son proteínas multiméricas con una masa molecular total de 230-270 kDa. La expresión de estas cinco subunidades en regiones específicas del cerebro forman los diferentes subtipos de receptores GABA<sub>A</sub>. Las primeras subunidades de los canales iónicos de los receptores GABAérgicos se clonaron en 1987 (Schofield *et al.*, 1987) y a fecha de hoy se han identificado siete clases de subunidades polipeptídicas distintas con sus correspondientes variantes:  $\alpha$ ,  $4\beta$ ,  $3\gamma$ ,  $1\delta$ ,  $1\epsilon$ ,  $1\pi$  y  $3\rho$  (Barnard *et al.*, 1998; Bonnert *et al.*, 1999) que dan lugar a múltiples combinaciones entre ellas para formar receptores GABAérgicos A y C, con distintas afinidades por sustancias químicas (Johnston, 1996a; Davies *et al.*, 1997; Chebib y Johnston, 1999; Barnard, 2000; Korpi *et al.*, 2002). La Figura 8 ilustra la secuencia de las siete familias diferentes en que se dividen estructuralmente los receptores GABA y sus relaciones.

Los distintos ligandos presentan sitios de unión diferentes dentro del receptor GABAérgico en función de las subunidades expresadas:  $\alpha\beta$  para el GABA, muscimol, y

barbitúricos;  $\alpha\gamma$  para benzodiazepinas;  $\alpha\beta\gamma$  para neuroesteroides (Ratra *et al.*, 2001). El sitio de unión de la PTX parece estar en el propio canal de  $\text{Cl}^-$  (Ffrench-Constant *et al.*, 1993a).



**Figura 8. Dendrograma que representa la relación de las secuencias de aminoácidos entre las diferentes sub-unidades del receptor  $\text{GABA}_A$ .** nAChR  $\delta$  : Receptor de Acetilcolina tipo  $\delta$ ;  $5\text{HT}_3$ : Receptor de serotonina tipo 3.

La distribución de las principales subunidades ha sido descrita en diversas regiones del SNC (Hevers y Luddens, 1998; Whiting *et al.*, 1999) (Tabla 5). La subunidad  $\alpha_1$  es la más abundante del SNC, con una expresión predominante en el cerebelo. A menudo se combina con la subunidad  $\beta_2$ . La subunidad  $\gamma_2$  se encuentra en casi todas las regiones del cerebro, aunque en cantidad variable (Gutierrez *et al.*, 1994). Esta suele combinarse con  $\alpha_1\beta_2$ . Por lo tanto, la combinación de subunidades más abundante en estos receptores es la  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ . A diferencia de  $\alpha_1$ , las subunidades  $\alpha_2$  a  $\alpha_5$  se expresan predominantemente en el hipocampo, mientras que el cerebelo parece carecer de estas subunidades. Las subunidades  $\alpha_1$  a  $\alpha_4$  se expresan en la corteza cerebral, que a su vez sólo expresa niveles bajos de  $\alpha_5$ . Algunas de las subunidades, por ejemplo  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$  y  $\beta_3$ , predominan durante el desarrollo embrionario (Laurie *et al.*, 1992; Poulter y Brown, 1999),



donde los receptores intervienen en la diferenciación y construcción de los distintos circuitos neuronales (Belhage *et al.*, 1998). Los receptores con subunidades  $\alpha_4$  se encuentran sobre todo en el tálamo, hipocampo, corteza, cuerpo estriado y bulbo olfatorio (Mckernan y Whiting, 1996; Benke *et al.*, 1997; Sur *et al.*, 1999). La subunidad  $\alpha_5$  sólo se expresa de forma importante en el hipocampo, donde supone el 20% de la población de receptores GABA<sub>A</sub>, en la corteza, bulbo olfatorio, hipotálamo y núcleo sensorial trigémino (Wisden *et al.*, 1992; Fritschy y Moler, 1995; Quirk *et al.*, 1996; Sur *et al.*, 1998) y los que contienen subunidades  $\alpha_6$  parecen expresarse casi exclusivamente en las células granulares del cerebelo (Quirk *et al.*, 1994; Mckernan y Whiting, 1996, Luddens *et al.*, 1990), aunque también se encontraron rastros en la cóclea dorsal. Los receptores  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  tienen una elevada densidad en la corteza cerebral, hipocampo, giro dentado, globo pálido, cuerpo estriado, núcleos talámicos, bulbo olfatorio y, sobre todo, las células de Purkinje del cerebelo (Benke *et al.*, 1991; Gao *et al.*, 1993, 1995; Mckernan y Whiting, 1996). Esta isoforma de receptor se caracteriza por tener baja sensibilidad a la inhibición por iones de zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) y una farmacología para las benzodiazepinas de “tipo I” (BZ1 o  $\omega_1$ ), al contrario que los receptores  $\alpha_2\beta\gamma_2$ ,  $\alpha_3\beta\gamma_2$  o  $\alpha_5\beta\gamma_2$  que son de “tipo II” (BZ2 o  $\omega_2$ ). La combinación  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$  constituye la segunda más importante de receptores GABA<sub>A</sub> del SNC, y se encuentra sobre todo en el hipocampo, cuerpo estriado, corteza cerebral, bulbo olfatorio, oliva inferior y en astas medulares anteriores y posteriores (Wisden *et al.*, 1992; Gao *et al.*, 1993; Fritschy y Moler, 1995; Mckernan y Whiting, 1996). La combinación  $\alpha_3\beta_3\gamma_2$  constituye la tercera más importante en el SNC y se encuentra sobre todo en la corteza cerebral, hipocampo, cuerpo estriado, núcleo talámico reticular, cerebelo y formación reticular bulbar (Wisden *et al.*, 1992; Gao *et al.*, 1993; Fritschy y Moler, 1995; Mckernan y Whiting, 1996).

Las subunidades  $\rho_{1-3}$  se expresan sobre todo en neuronas horizontales y bipolares de la retina dando lugar a los receptores GABA<sub>C</sub> (Hanley *et al.*, 1999). A diferencia de lo que ocurre con las subunidades de los receptores GABA<sub>A</sub>, las subunidades  $\rho$  pueden formar receptores homoméricos funcionales con estructura pentamérica así como receptores heteroméricos de diferentes subunidades  $\rho$  (Enz y Cutting, 1998 y 1999; Ratra *et al.*, 2002). Así mismo no se unen a

## INTRODUCCIÓN

subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Comparten tan sólo el 30-38% de la secuencia de aminoácidos con las subunidades de los receptores GABA<sub>A</sub>. Qian *et al.* (1999) indicaron que *in vivo* las subunidades  $\rho$  pueden ser también combinaciones heteroméricas con subunidades  $\gamma$ . En un principio, se pensaba que las subunidades  $\rho$  únicamente se localizaban en la retina pero se ha visto que la subunidad  $\rho 3$  de la rata se expresa en otras zonas del SNC como el hipocampo (Von Bohlen y Dermietzel, 2002a) además de ser más abundante en el SNC embrionario que en el adulto, al contrario que las otras dos subunidades  $\rho$  (Ogurusu *et al.*, 1999). La subunidad  $\rho 2$  está presente sobre todo en el hipocampo y la subunidad  $\rho 1$  está prácticamente restringida al colículo superior (Enz *et al.*, 1995). Algunos autores consideran a los receptores GABA<sub>C</sub> como un subtipo de receptores GABA<sub>A</sub> o los denominan receptores GABA<sub>NANB</sub> (no A, no B) o receptores  $\rho$  (Barnard *et al.*, 1998; Johnston, 2001; Krosgaard-Larsen *et al.*, 2002).

Isoforma	Abundancia en el SNC de la rata (%)	Localización	Referencias
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	43	En todo el SNC, especialmente células de Purkinje cerebelares, hipocampo y corteza	Benke <i>et al.</i> (1991); Mckernan y Whiting (1996)
$\alpha 2\beta 2/3\gamma 2$	18	Hipocampo, estriado y neuronas motoras de la médula espinal	Wisden <i>et al.</i> (1992); Mckernan y Whiting (1996)
$\alpha 3\beta \gamma 2/3$	17	En corteza principalmente (neuronas colinérgicas y monoaminérgicas)	Wisden <i>et al.</i> (1992); Mckernan y Whiting (1996)
$\alpha 2\beta \gamma 1$	8	Glía de Bergmann	Wisden <i>et al.</i> (1992); Mckernan y Whiting (1996)
$\alpha 5\beta 3\gamma 2/3$	4	Hipocampo, corteza y bulbo olfatorio	Wisden <i>et al.</i> (1992); Mertens <i>et al.</i> (1993); Mckernan y Whiting, (1996); Quirk <i>et al.</i> (1996); Sur <i>et al.</i> (1998)
$\alpha 4\beta \delta$ y $\alpha 4\beta \gamma 2$	3	Tálamo e hipocampo (giro dentado)	Benke <i>et al.</i> (1991); Mckernan y Whiting (1996); SUR <i>et al.</i> (1999)
$\alpha 6\beta \gamma 2$	2	Células granulares del cerebelo	Quirk <i>et al.</i> (1994); Mckernan y Whiting (1996)
$\alpha 6\beta \delta$	2	Células granulares del cerebelo	Quirk <i>et al.</i> (1994); Mckernan y Whiting (1996)

**Tabla 5. Principales combinaciones de subunidades de receptores GABA<sub>A</sub> presentes en el SNC de mamíferos.**

### 1.2.2.1.2. GABA y los receptores GABAérgicos asociados a canales de Cl<sup>-</sup> en invertebrados

Aunque los receptores ionotrópicos GABA de invertebrados también forman canales de apertura selectivos mediados por aniones y se antagonizan por PTX, no se pueden incluir en ninguno de los tipos de receptores descritos para vertebrados. A diferencia de los receptores GABA<sub>A</sub> de mamíferos, la mayoría son insensibles a la bicuculina (Sattelle, 1990), y difieren de los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> en su sensibilidad a los agonistas y antagonistas del GABA y sus moduladores alostéricos (Rauh *et al.*, 1990). Sin embargo, los receptores GABA de invertebrados asociados a canales de Cl<sup>-</sup>, si tienen en común con los receptores GABAérgicos de mamíferos el ser heteroméricos, puesto que se encuentran formados por distintas subunidades (Hosie *et al.*, 1997). En la actualidad, se han clonado en *Drosophila melanogaster* tres clases de subunidades de receptores GABA (codificadas por sus respectivos genes):

- Subunidad RDL (Resistant to Dieldrin; resistente a dieldrín): El gen que codifica la subunidad RDL del receptor GABA se aisló por primera vez en 1991 a partir de una cepa de origen natural resistente a dieldrin del díptero *Drosophila melanogaster* (Ffrench-Constant *et al.*, 1991; Ffrench-Constant *et al.*, 1993a; Ffrench-Constant y Rocheleau, 1993). No es exclusiva de *D. melanogaster* pues se ha identificado en otras especies de insectos, como en *Aedes aegypti*, *Drosophila simulans*, en la mosca doméstica *Musca domestica* (dípteros), en la cucaracha *Blattella germanica* (dictiópteros) y en los escarabajos *Tribolium castaneum* y *Hypothenemus hampei* (coleópteros). Son subunidades altamente conservadas. Se distribuyen tanto por el sistema nervioso adulto (Harrison *et al.*, 1996) como por el embrionario de *D. melanogaster* (Aronstein y Ffrench-Constant, 1995). Sin embargo, no se encuentran en el músculo (Harrison *et al.*, 1996) a pesar de hallarse un flujo de Cl<sup>-</sup> mediado por GABA en estas células (Rauh *et al.*, 1997; Schnee *et al.*, 1997), lo que sugiere la existencia de canales de cloro mediados por GABA que no contienen la subunidad RDL en dichas células musculares. Su patrón de expresión sugiere que intervienen en una transmisión sináptica GABAérgica rápida (Buchner *et al.*,

1988; DiAntonio *et al.*, 1993; Harrison *et al.*, 1996), en el aprendizaje (Harrison *et al.*, 1996; Strambi *et al.*, 1998; Sattelle *et al.*, 2000) así como en el procesamiento visual y olfativo (Harrison *et al.*, 1996). Es la única subunidad en los insectos que forma un canal funcional de Cl<sup>-</sup> mediado por GABA (Hosie *et al.*, 1997; Ozoe y Akamatsu, 2001).

- Subunidad GRD (GABA<sub>A</sub> and Glycine-like Receptor of *Drosophila melanogaster*; receptor de *Drosophila melanogaster* similar al GABA<sub>A</sub> y al receptor de glicina): El gen de la subunidad GRD codifica un gran polipéptido de 614 residuos que muestra entre un 33-44% de la identidad de las subunidades de los receptores GABA de vertebrados aunque es único en tanto que contiene un larga inserción (75 aminoácidos) entre el Cys-loop y la primera membrana del dominio de extensión.
- Subunidad LCCH3 (*Ligand-gated Chloride Channel homologue 3*; canal asociado a canales de Cl<sup>-</sup> homólogo 3): Es homóloga a la subunidad β de mamíferos con la que comparte un 47% de su identidad (Bloomquist, 2001).

La subunidad RDL en *D. melanogaster* se puede expresar de forma heteróloga para formar receptores homo-oligoméricos (Millar *et al.*, 1994) que van a tener una farmacología similar a la de los receptores GABA nativos de los insectos, lo que se traduce en que dicha subunidad es un buen modelo para el estudio de estos receptores que son la diana de muchos insecticidas incluyendo el fipronil. Estos receptores homoméricos RDL se distinguen de los receptores GABA<sub>A</sub> de vertebrados por su insensibilidad a la bicuculina y su mayor sensibilidad tanto a la gabacina (Hosie y Sattelle, 1996a) como al muscinol (Buckingham *et al.*, 1994). A su vez se distinguen de los receptores GABA<sub>C</sub> de vertebrados por su mayor eficacia al muscimol, al ácido cis-aminocrotónico (CACA) y a la gabacina. Sin embargo si se han observado diferencias entre los receptores homoméricos RDL y los receptores GABA nativos de insectos en cuanto a la sensibilidad a las benzodiacepinas puesto que en estos últimos su acción resulta más potente (Millar *et al.*, 1994).

## INTRODUCCIÓN

Estudios de expresión heteróloga evidencian que la coexpresión de la subunidad RDL junto con las demás subunidades va a dar lugar a receptores con distinta farmacología (Tabla 6). La coexpresión de las subunidades GRD y LCCH3 en los oocitos de *Xenopus laevis* da lugar a un canal catiónico mediado por GABA (Gisselmann *et al.*, 1994). Por otro lado Zhang *et al.* (1995) observaron que la coexpresión de las subunidades RDL y LCCH3 forma un canal con farmacología muy diferente a la mayoría de receptores GABA nativos de los insectos puesto que se muestra insensible a la PTX y sensible a la bicuculina. A día de hoy, la coexpresión de la subunidad RDL junto con la subunidad GRD no ha sido estudiada.

<i>Combinación de subunidades</i>	<i>Expresión heteróloga</i>	<i>Farmacología</i>	<i>Referencia</i>
RDL	Oocitos, células S2 (canal aniónico)	Sensible a picrotoxina  Insensible a bicuculina	Hosie and Satelle, 1996a
RDL + LCCH3	Sf-9	Insensible a picrotoxina  Sensible a bicuculina	Zhang <i>et al.</i> , 1995
RDL + GRD	No estudiado	No estudiado	N/A
GRD + LCCH3	Oocitos  (canal catiónico)	Sensible a picrotoxina  Insensible a bicuculina	Gisselmann <i>et al.</i> , 2004

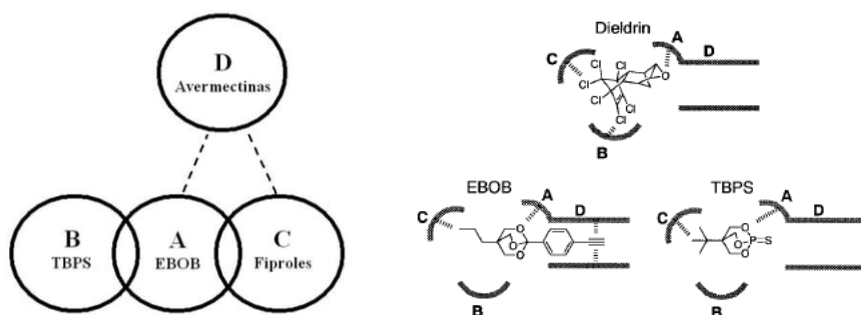
**Tabla 6. Receptores y subunidad RDL.** La expresión heteróloga de la subunidad RDL a solas o junto a otras subunidades del receptor GABA de insectos, da lugar a distintos receptores con diferentes farmacologías.

A pesar de que tanto el [ $^{35}\text{S}$ ]tert-butilbiciclofosforotionato ([ $^{35}\text{S}$ ]TBPS) como el 4'-[ $^3\text{H}$ ]etenil-4-n-propilbenciloortobenzoato ([ $^3\text{H}$ ]EBOB) son simples convulsivantes, sus formas radiomarcadas parecen ser los mejores ligandos antagonistas empleados en los ensayos de unión al receptor, puesto que ambos compuestos actúan tanto en mamíferos como en insectos como antagonistas no competitivos bloqueando el flujo de  $\text{Cl}^-$  al ser su diana el sitio de unión al receptor GABA. Se ha identificado, basándose en estos estudios de unión de los radioligandos [ $^3\text{H}$ ]EBOB y [ $^{35}\text{S}$ ]TBPS al receptor GABAérgico asociado a canales de  $\text{Cl}^-$  situados en las membranas de la

cabeza de *Musca domestica* L., la existencia de un mismo sitio de unión en los receptores de insectos para los antagonistas no competitivos, el cual a su vez comprende un máximo de cuatro sitios de unión que pueden interaccionar entre sí (Deng *et al.*, 1993; Rauh *et al.*, 1997; Gant *et al.*, 1998; Grolleau y Satelle, 2000; Ozoe y Akamatsu, 2001) (Figura 9 y Figura 10).

- Sitio A: Interaccionan con él los ligandos electronegativos, como son los 1-aril-trioxabicyclo-octanos (p. ej. EBOB), los policlorocicloalcanos, sobre todo los análogos del lindano, la PTX, los aril-silatranos y los 2-aril-ditianos. En él se van a encontrar muchos espacios para interaccionar tanto con las partes hidrofóbicas como electronegativas de los citados ligandos.
- Sitio B: Va a interaccionar con los trioxabicyclo-octanos del tipo de los ésteres de ácidos biciclofosfóricos (p. ej. TBPS) y los tritiabicyclooctanos y ditianos que tengan sustituyentes de pequeño tamaño.
- Sitio C: Con el que interacciona el fipronil.
- Sitio D: Es el lugar de unión para las ivermectinas.

Las modificaciones que afecten a los sitios A y C pueden dar lugar a resistencias al dieldrín, mientras que el sitio D estaría relacionado en parte con los sitios A y C, pero no con el B.



**Figura 9. Modelo de receptor GABAérgico asociado a canales de Cl⁻ en *Musca doméstica L.*, según Deng *et al.* (1993).**

**Figura 10. Modelo de los sitios de unión para los antagonistas no competitivos en el receptor GABA de insectos, según Ozoe y Akamatsu (2001).** La activación de los sitios A y C da lugar a signos de intoxicación idénticos y son responsables de la resistencia cruzada al dieldrín. Los policlorocicloalcanos y algunos ésteres del TBPS pueden interaccionar tanto en el sitio A como con el B. El sitio D está relacionado con el A y con C, pero no con el B. El GABA interaccionaría con el sitio A, que está relacionado con todos los demás, lo que explicaría la modificación de su respuesta por los ligandos que interaccionen en otros sitios. Este modelo no tiene en cuenta la acción de agonistas como el muscimol, que podría suponer la existencia de sitios de unión adicionales.

#### 1.2.2.1.3. Acción del fipronil sobre receptores GABAérgicos asociados a canales de Cl⁻

El objetivo de los distintos insecticidas, incluyendo el fipronil, es el sitio de unión de los antagonistas convulsivantes al receptor GABA, aunque para el caso del fipronil, a concentraciones micromolares también se ha demostrado que es un potente bloqueante de los canales de cloruro de L-glutamato de insectos (Ikeda *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004b) y nematodos (Horoszok *et al.*, 2001). Las diferencias farmacológicas entre los receptores GABA de insectos y vertebrados en este sitio de unión, son la base de la selectividad de estos compuestos por parte de los insectos.

En los años 60, los policlorocicloalcanos fueron los primeros insecticidas en ser comercializados con actividad sobre los receptores GABAérgicos asociados a canales de Cl⁻, aunque no sería hasta 1982 cuando se sugirió por primera vez que precisamente este era su mecanismo de acción (Ghiasuddin y Matsumura, 1982). Posteriormente, distintos estudios en los que se utilizaban concentraciones micromolares de policlorocicloalcanos y PTX mostraban que eran capaces de antagonizar la hiperpolarización inducida por el GABA de forma mixta, esto es,

de forma competitiva y no competitiva (Bloomquist *et al.*, 1991). Este antagonismo mixto podría deberse a que estas sustancias actúan estabilizando un receptor unido al GABA en el que el canal de Cl<sup>-</sup> se encuentra cerrado, o bien estabilizando una forma desensibilizada del receptor GABAérgico, y que el resto de alanina en la posición 302 del segmento M2 juega un papel crítico en esta acción (Bloomquist, 2001).

### **Mecanismo de acción del fipronil sobre receptores de invertebrados**

Diferentes experimentos con receptores homomultiméricos de subunidades RDL expresadas en oocitos de *Xenopus*, mostraron que el fipronil puede inhibir las corrientes de iones de Cl<sup>-</sup> evocadas por GABA, aunque en función de si se toma un estudio u otro estos valores de CI<sub>50</sub> pueden variar desde 28 nM (Buckingham *et al.*, 1994; Hosie *et al.*, 1995; Narahashi *et al.*, 2007) a 100 nM (Gant *et al.*, 1998) o 0,5-3 nM (Ratra *et al.*, 2001). Estudios similares en los que se clonan subunidades RDL de *Drosophila melanogaster* y *Heliothis virescens* obtienen valores de CI<sub>50</sub> de 250 y 110 nM, respectivamente (Wolff y Wingate, 1998).

### **Resistencia de los receptores de invertebrados a la acción del fipronil**

La utilidad de un insecticida está a menudo limitada por el desarrollo de resistencias, que son comunes en las poblaciones de campo de muchas especies de insectos (Georghiu, 1986).

En la actualidad no se ha comunicado ningún caso de resistencia directa al fipronil, aunque se ha demostrado que algunas estirpes de cucaracha alemana (*Blattella germanica* L.) parecen presentar una mayor tolerancia al fipronil al compararlas con estirpes de laboratorio (Holbrook *et al.*, 2003). Por contra, la aparición de resistencias sí es frecuente en el caso de los ciclodienos y los trioxabicyclo-octanos. Distintos estudios neurofisiológicos en cultivos neuronales de estirpes RDL de *Drosophila melanogaster* (resistentes a dieldrín) indican que la resistencia se debe a una disminución de la sensibilidad al bloqueo de las corrientes de Cl<sup>-</sup> en los receptores GABAérgicos (Bloomquist, 2001). La resistencia a ciclodienos presenta también una



elevada resistencia cruzada con un amplio número de insecticidas con actividad convulsivante que actúan bloqueando los canales de  $\text{Cl}^-$  asociados a receptores GABAérgicos (Bloomquist, 1996). Sin embargo, esta resistencia cruzada prácticamente no se observa con las avermectinas (Cole *et al.*, 1995) que, si bien tienen un mecanismo de acción principal sobre receptores de glutamato asociado a canales de  $\text{Cl}^-$ , actúan como agonistas parciales de receptores  $\text{GABA}_A$  (Abalis *et al.*, 1986).

En el caso de la resistencia en *D. melanogaster* al dieldrín, ésta surge de la sustitución en el lumen del canal del receptor de GABA de un único aminoácido, la alanina (Ala) por serina (Ser) (Ala→Ser) en la posición 2 (Hosie *et al.*, 1997; Ffrench-Constant *et al.*, 2000; Bass *et al.*, 2004). En el pulgón *Myzus persicae*, la resistencia a los ciclodienos se produce como consecuencia de una mutación de Ala a glicina (Gly) (Ala→Gly) (Anthony *et al.*, 1998). En el caso de la resistencia al fipronil, en la región equivalente RDL de *Drosophila simulans*, también se ha demostrado que surge de dos mutaciones, una de ellas de Ala→Gly, similar a la mutación equivalente en *D. melanogaster*, y una mutación T350M en el tercer dominio transmembrana (Le Goff *et al.*, 2005). La mutación en Thr350 no ha sido descrita en ninguna población de campo de *D. melanogaster* resistente a dieldrin o en cualquier otra población de mosquitos. La resistencia alcanzada en el laboratorio (Le Goff *et al.*, 2005) puede surgir a partir de una presión de selección diferente de la del campo, lo que va a dar lugar a diferentes mutaciones. En estudios funcionales de expresión, comparando las formas de la subunidad RDL de *D. melanogaster* de tipo salvaje y resistente, 2' Ala→Ser confiere resistencia a una variedad de insecticidas, tales como el fipronil, dieldrin, picrotoxina y picrodendrin-O, los cuales van a actuar alostéricamente como antagonistas no competitivos de los receptores GABA de insectos. Esta resistencia de los ciclodienos va a provocar un doble efecto: por un lado una disminución de la afinidad de unión del insecticida al receptor y por otro un aumento del tiempo de apertura de los canales de  $\text{Cl}^-$  junto a una disminución del tiempo que permanecen cerrados (Zhang *et al.*, 1994).

En estirpes de *Musca domestica* resistentes a ciclodienos se realizaron los primeros estudios de resistencia llevados a cabo con fipronil. Dichos estudios de toxicidad mostraban que eran unas 90 veces menos sensibles al fipronil que las moscas normales (Bloomquist, 1993). Sin embargo, la resistencia afecta más a los ciclodienos ya que las moscas eran unas 30 veces menos resistentes al fipronil que al dieldrín. En estudios de toxicidad por contacto, Bloomquist y Robinson (1999) señalaron que las estirpes RDL de *Drosophila melanogaster* eran 35 veces más resistentes al fipronil. Hosie *et al.* (1995) observaron una alta resistencia al fipronil y a la PTX en receptores de estirpes RDL de *Drosophila melanogaster* expresados en oocitos de *Xenopus*, donde concentraciones de fipronil de 100  $\mu$ M no eran capaces de inhibir ni un 50% de la corrientes inducidas por el GABA, mientras que en las estirpes no resistentes era suficiente una concentración de fipronil de 20  $\mu$ M. Wolff y Wingate (1998) indicaron que estirpes de *Heliothis virescens* con un resto de serina en vez de alanina en el segmento M2 eran 15 veces más resistentes al fipronil a la hora de bloquear las corrientes inducidas por el GABA. Sorprendentemente, no se observó resistencia en estirpes de *Drosophila melanogaster* con esta misma mutación, dato que permite dilucidar algunas hipótesis en cuanto a la relación estructura-actividad de estos compuestos.

En cucarachas, la resistencia al fipronil parece ser menor que la observada en moscas. Las estirpes de *Blattella germanica* resistentes al lindano y dieldrín también presentan resistencia al fipronil (únicamente 1,6 veces el valor de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) en cucarachas no resistentes) (Valles *et al.*, 1997). También se encontró una baja resistencia al fipronil en estirpes de *Blattella germanica* resistentes a clordano y dieldrín (2,4 y 7,7 veces el valor de la DL<sub>50</sub>, respectivamente) (Scott y Wen, 1997; Bloomquist y Robinson, 1999). Por el contrario, en un estudio reciente, Holbrook *et al.* (2003) han identificado estirpes Cr-Al de *Blattella germanica* que son 17 veces más resistentes que las estirpes susceptibles.

### Mecanismo de acción del fipronil sobre receptores de mamíferos

En microvesículas del encéfalo de ratón macho Swiss-Webster, el fipronil bloquea la entrada de  $^{36}\text{Cl}$  (Cole *et al.*, 1993) con valores de  $\text{CI}_{50}$  por encima de  $10\text{ }\mu\text{M}$ , muy superiores a los observados en distintos ciclodienos (Bloomquist, 1998). En receptores de rata, el fipronil también bloquea la unión del  $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ ,  $[^{35}\text{S}]\text{TBPS}$  y  $[^3\text{H}]\text{BIDN}$  con un valor de  $\text{CI}_{50}$  de  $0,5\text{-}1,0\text{ }\mu\text{M}$ , mientras que este valor para la unión del EBOB en membranas obtenidas de *Musca domestica* es de  $8\text{ nM}$  (Gant *et al.*, 1998). En 1993 Cole *et al.*, informaron que el desplazamiento del  $[^3\text{H}]\text{EBOB}$  en preparados de membrana de cabeza de *Musca domestica* y de encéfalo de ratón por el fipronil presentaban un valor de  $\text{CI}_{50}$  de  $2,3\text{ nM}$  y  $4,3\text{ }\mu\text{M}$ , respectivamente. Se obtuvieron resultados similares con un valor de  $\text{CI}_{50}$  de  $6,3\text{ nM}$  para *Musca domestica*;  $7,7\text{ nM}$  para *Drosophila melanogaster*; y  $1,01\text{ }\mu\text{M}$  para el ratón macho Swiss Webster (Hainzl y Casida, 1996; Hainzl *et al.*, 1998). Los valores de razón de selectividad relativa al receptor GABAérgico del hombre ( $\text{CI}_{50}$  hombre/ $\text{CI}_{50}$  insectos) fueron de 135 para el fipronil; 78 para el lindano; 17 para la sulfona del fipronil, el principal metabolito identificado en ratones (Hainzl y Casida, 1996); y 16 para el destiofipronil (Hainzl *et al.*, 1998). Zhao *et al.* (2003), en un trabajo reciente mediante técnicas de *patch-clamp* con registro de célula completa, observaron que el valor de  $\text{CI}_{50}$  en receptores de ganglios torácicos de cucaracha americana (*Periplaneta americana* L.) ( $28\text{ nM}$ ) era 59 veces inferior que la  $\text{CI}_{50}$  en receptores  $\text{GABA}_A$  de rata. Por el contrario, no se observaba con el dieldrín ningún grado de selectividad. Todos estos estudios indican una mayor sensibilidad de los receptores GABAérgicos de insectos que los de mamíferos por el fipronil, lo que haría esperar una menor toxicidad en estos últimos, sobre todo si se compara con otro tipo de insecticidas.

En cultivos de neuronas procedentes de los ganglios de la raíz dorsal de ratas neonatas (2-5 días), se ha estudiado la acción del fipronil sobre receptores  $\text{GABA}_A$  mediante técnicas de *patch-clamp* con registro de célula completa (Ikeda *et al.*, 2001). La corriente inducida por el GABA se suprimía de forma reversible por el fipronil, tanto en el receptor no activado (canales de  $\text{Cl}^-$  asociados no activados) como activado, con valores similares de  $\text{CI}_{50}$ ,  $1,66\text{ }\mu\text{M}$  y  $1,61\text{ }\mu\text{M}$ ,

respectivamente. Las velocidades de asociación y disociación del fipronil en el receptor GABA<sub>A</sub> activado eran superiores respectivamente a las del receptor no activado en 9,8 y 6,2 veces. Estos resultados indicarían que si bien el fipronil puede unirse tanto al receptor activado como cerrado, la apertura de los canales facilita su unión y liberación del receptor. En este estudio la aplicación de PTX y fipronil mostró que no competían por el mismo sitio de unión en el receptor GABAérgico. Estos resultados no se podrían extrapolar a otras neuronas del SNC de mamíferos, puesto que las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal de ratas neonatas se caracterizan por contener sobre todo subunidades  $\alpha 2$  (Persohn *et al.*, 1991; Serafini *et al.*, 1998). Se utilizó, en un estudio posterior, la técnica de *patch-clamp*, de manera que en vez de cuantificar la corriente que atraviesa toda la superficie de la neurona se determinaba la corriente iónica que atraviesa el canal de Cl<sup>-</sup>, y se vio que el fipronil suprimía las corrientes inducidas por el GABA mediante una disminución del tiempo y frecuencia de apertura de los canales (Ikeda *et al.*, 2004).

Como ya hemos visto, la subunidad  $\beta 3$  del receptor GABA<sub>A</sub> homopentamérico de humanos, reconoce a todos los insecticidas GABAérgicos incluyendo el fipronil (Ratra *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006) y reproduce la alta sensibilidad al insecticida y las relaciones estructura-actividad del receptor nativo de insectos (Ratra y Casida, 2001).

En el estudio de Ratra y Casida de 2001 se observó que el radioligando y bloqueador del canal de Cl<sup>-</sup> [<sup>3</sup>H]EBOB se une de manera similar en el cerebro humano y en las membranas de mosca doméstica, permitiendo con ello la comparación directa de sus sitios de unión en los receptores "nativos" (Deng *et al.*, 1991; Cole y Casida, 1992). Este radioligando también se une con alta afinidad a los receptores recombinantes humanos homooligoméricos  $\beta 3$  así como a los receptores  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$  expresados en células Sf9 (derivadas de ovarios del insecto *Spodoptera frugiperda* usando el sistema de baculovirus), y a los receptores humanos presentes en el encéfalo humano (receptores nativos) (Ratra *et al.*, 2001). En este estudio se obtuvieron los siguientes valores de CI<sub>50</sub>: 2,4 nM para los receptores homoméricos  $\beta 3$ , 33 nM para los receptores heteroméricos  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$  y 2470 nM para los receptores de encéfalo humano. Estos valores de CI<sub>50</sub>

eran claramente distintos a los observados para el lindano (0,90 nM en  $\beta 3$ , 21 nM en  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$  y 306 nM en encéfalo humano) y para el  $\alpha$ -endosulfano (0,47 nM en  $\beta 3$ , 16 nM en  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$  y 7,3 nM en encéfalo humano). En este mismo estudio de Ratra *et al.* (2001), al ensayar con los metabolitos del fipronil (sulfuro, sulfona y destiofipronil) se descubrieron resultados similares a éste en los receptores  $\beta 3$  y  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ , a excepción de lo que ocurre en los receptores nativos encefálicos donde eran más potentes que el propio fipronil, con valores de  $CI_{50}$  de 343 nM para el sulfuro, 283 nM para la sulfona y 237 nM para el destiofipronil. El etiprol, otro fenilpirazol, presentaba menor potencia en los tres receptores (63 nM en  $\beta 3$ , 1.230 nM en  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$  y >10.000 nM en encéfalo humano). Así mismo, también se observó en el estudio la baja potencia de la PTX en los tres receptores, al encontrarse valores de  $CI_{50}$  de 32 nM en  $\beta 3$ , 1820 nM en  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$  y 2730 nM en el receptor nativo. Por tanto el fipronil resulta tener cierta selectividad de manera que es un buen inhibidor del receptor homomérico  $\beta 3$  pero no del receptor nativo de encéfalo humano. Por otro lado, la combinación de la subunidad  $\beta 3$  en un receptor con las subunidades  $\alpha 1$  y  $\gamma 2$  disminuye su potencia lo que indicaría que una subunidad en los insectos similar a la  $\beta 3$  podría ser el lugar diana del fipronil, si bien *in vivo* el resto de subunidades presentes en el receptor van a afectar sus propiedades. Estudios posteriores confirmarían el hecho de que las distintas subunidades que acompañan a la subunidad  $\beta 3$  modifican la potencia de unión del fipronil y su selectividad con respecto a otros insecticidas, tal y como se indica en la Tabla 7.

En este mismo estudio, Ratra *et al.* (2001), observaron que todos los receptores humanos  $GABA_A$  que no contienen la subunidad  $\beta 3$  eran inactivos puesto que esta subunidad es necesaria en solitario o con otra subunidad para el ensamblaje del sitio de unión del [ $^3H$ ]EBOB (Tabla 8). Además, concluyeron que el factor de selección entre los receptores humanos y los de mosca doméstica, aumenta de 2,8 veces para el endosulfán a 76 veces para el lindano y 1870 veces para el caso del fipronil.

Receptor	CI <sub>50</sub> (nm) <sup>a</sup>		
	$\alpha$ -Endosulfan	Lindano	Fipronil
<i>Recombinante con la subunidad <math>\beta 3</math></i>			
$\beta 3$	0.47 $\pm$ 0.20	0.90 $\pm$ 0.14	2.4 $\pm$ 0.3
$\alpha 6\beta 3$	4.0 $\pm$ 1.5	1.3 $\pm$ 0.5	3.1 $\pm$ 0.7
$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	4.6 $\pm$ 1.0	4.9 $\pm$ 0.8	17 $\pm$ 1
$\alpha 1\beta 3$	8.3 $\pm$ 5.4	12 $\pm$ 6	28 $\pm$ 6
$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	16 $\pm$ 3	21 $\pm$ 9	33 $\pm$ 13
<i>Recombinante con la subunidad <math>\beta 1</math></i>			
$\alpha 1\beta 1$	117 $\pm$ 12	112 $\pm$ 42	7700 $\pm$ 3300
$\alpha 1\beta 1\gamma 2$	40 $\pm$ 8	67 $\pm$ 24	2800 $\pm$ 1570
Nativo	7.3 $\pm$ 3.3	306 $\pm$ 12	2470 $\pm$ 370

**Tabla 7. Efecto de la composición de las subunidades en la potencia de unión y selectividad del  $\alpha$ -endosulfán, lindano y fipronil.** <sup>a</sup> Datos usando la misma metodología para  $\beta 3$ ,  $\alpha 1\beta 1\gamma 2$  y receptores nativos de Ratra *et al.* (2001) y para receptores  $\alpha 6\beta 3$ ,  $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ ,  $\alpha 1\beta 3$ ,  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 1\beta 1\gamma 2$  provenientes de nuevos estudios.

R sustituyente	CI <sub>50</sub> (nM)		
	$\beta 3$	$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	Nativo
SCF <sub>3</sub>	1.7 $\pm$ 0.3	37 $\pm$ 17	343 $\pm$ 49
SO <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	3.9 $\pm$ 1.6	77 $\pm$ 25	283 $\pm$ 24
CF <sub>3</sub>	4.8 $\pm$ 2.1	37 $\pm$ 5	237 $\pm$ 45
TBPS	59 $\pm$ 12	55 $\pm$ 14	107 $\pm$ 19
Picrotoxina	32 $\pm$ 12	1,820 $\pm$ 650	2,730 $\pm$ 30

**Tabla 8. Papel del receptor GABA<sub>A</sub> humano.**

Además de sobre los receptores GABA<sub>A</sub> de mamíferos, la acción del fipronil también ha sido estudiada en los receptores GABA<sub>C</sub> gracias a ensayos de radioligandos de unión con [<sup>3</sup>H]EBOB en receptores GABA<sub>C</sub> homoméricos  $\rho 1$  expresados en células embrionarias de riñón humano (HEK293) (Cole y Casida, 1992; Ratra *et al.*, 2002). Se vio que tanto el fipronil como sus derivados (sulfuro, sulfona y destiofipronil) eran principalmente inactivos al receptor  $\rho 1$  pues no eran capaces de desplazar el radioligando de su sitio de unión (CI<sub>50</sub> 5.3 a > 10  $\mu$ M). El resto de compuestos estudiados resultaron ser más selectivos que el fipronil al receptor GABA<sub>C</sub> homomérico puesto que dieron como resultado valores de CI<sub>50</sub> de 4  $\mu$ M, 91 nM, 800nM y 860nM para la PTX, el lindano, el  $\alpha$ -endosulfano y el dieldrín respectivamente (Tabla 9). Además también se estudió el comportamiento de estos compuestos en estos mismos receptores pero en el caso de *Xenopus oocytes*, obteniendo resultados similares para el fipronil (CI<sub>50</sub> > 30  $\mu$ M), con lo

que claramente concluyeron la escasa selectividad que el fipronil muestra hacia los receptores GABA<sub>C</sub> homoméricos  $\rho 1$  presentes en los vertebrados. Sin embargo, actualmente no hay estudios de cómo se comporta el insecticida sobre el resto de receptores GABA<sub>C</sub>.

Componente	CI <sub>50</sub> (nM $\pm$ SEM)		
	GABA <sub>C</sub>	GABA <sub>A</sub>	
	$\rho 1$	$\beta 3$	Nativo
Picrotoxina	4000 $\pm$ 1000	32 $\pm$ 12	2730 $\pm$ 30
Lindano	91 $\pm$ 10	0.9 $\pm$ 1	306 $\pm$ 12
$\alpha$ -Endosulfan	800 $\pm$ 100	0.5 $\pm$ 2	7.3 $\pm$ 3.3
Fipronil	> 10000	2.4 $\pm$ 0.3	2470 $\pm$ 370
Dieldrín	860 $\pm$ 230		

**Tabla 9. Especificidad de los bloqueantes de canales de cloro, varios tipos de insecticidas y miméticos de GABA en el sitio de unión del [<sup>3</sup>H]EBOB del receptor homomérico GABA<sub>C</sub>  $\rho 1$  humano en comparación con los receptores homoméricos humanos  $\beta 3$  y el receptor nativo.**

### Mecanismo de acción molecular del fipronil

La importancia de la acción del fipronil en la existencia de una subunidad en insectos parecida a la subunidad  $\beta 3$  del receptor GABA<sub>A</sub> de mamíferos ha sido estudiada por Ratra *et al.* (2001) y Ratra y Casida (2001). Los receptores de *Drosophila melanogaster* y *Musca domestica* tienen una secuencia homóloga a la del receptor de la subunidad  $\beta$  de mamíferos, la cual es parte del cys-loop de la región TM2. Parece ser que el sitio de unión al insecticida en la subunidad  $\beta 3$  de mamíferos puede residir cerca del resto de Ala<sup>277</sup> dentro del revestimiento en el canal de iones de la segunda región transmembrana. Esta Ala<sup>277</sup> se sustituye por serina o glicina en las regiones equivalentes de las subunidades RDL de dichos insectos (Schofield *et al.*, 1987; Ffrench-Constant *et al.*, 1993b; Hosie *et al.*, 1997; Barnard *et al.*, 1998; Ffrench-Constant *et al.*, 2000; Ratra y Casida, 2001) (Figura 11).

<sup>273</sup>                      <sup>277</sup>                      <sup>291</sup>  
**Humano  $\beta 3$**  A A R V A L G I T T V L T M T T I N T  
***Drosophila*** S A R V A L G I T T V L T M T T I S T

**Figura 11. Secuencia de la subunidad  $\beta 3$  del receptor GABA<sub>A</sub> en el hombre y la subunidad RDL del receptor GABAérgico ionotrópico de *Drosophila melanogaster*. La secuencia en esta región es similar en la subunidad  $\beta 2$  y presenta una modificación en  $\beta 1$  (N290S).**

Se ha propuesto un modelo en el que la secuencia Val<sup>301</sup>-Ala<sup>302</sup>-Leu<sup>303</sup> en los cinco segmentos M2 del receptor va a formar un poro lipofílico centrosimétrico en el que podrían encajar los ciclodienos y otros antagonistas no competitivos como el fipronil (Brooks, 2001). Las moléculas tendrían cinco paredes en las que poder interaccionar debido a que es prácticamente centrosimétrico, lo que explicaría el que no exista diferencia en la toxicidad entre la mezcla racémica y los distintos estereoisómeros de algunas moléculas. Este es el caso del fipronil, un sulfóxido asimétrico que, por tanto, tiene dos enantiómeros, en el que no se observan, en el escarabajo del algodón (*Dysdercus cingulatus* F.), en el gorgojo del grano (*Sitophilus granarius* L.) y en la mosca doméstica (*Musca domestica*), diferencias en la toxicidad aguda y residual entre la mezcla racémica y los dos enantiómeros, lo que indicaría que no hay una forma quiral que interaccione mejor en el lugar de acción (Teicher *et al.*, 2003). En el caso de que la molécula fuese simétrica cabría esperar que fuesen más eficaces ya que podrían interaccionar con más de una pared del poro. Whittle *et al.* (1995) observaron que en moléculas en las que se sustituía el anillo pirazólico por distintos anillos heterocíclicos de pequeño tamaño y que conservaban el radical 2,6-dicloro-4-trifluorometilfenilo se podía predecir su actividad sobre los receptores GABAérgicos de *Musca domestica* y *Blattella germanica* a partir de la dirección del momento dipolar, de manera que el extremo final positivo del dipolo iba hacia el anillo bencénico en los compuestos activos. Este anillo, gracias al grupo trifluorometilo, es un buen atrayente de electrones y, según el modelo que propone Brooks (2001), se podría colocar en una región próxima al resto Arg<sup>300</sup>, de manera que el radical trifluorometilsulfinilo (atractivo de electrones) quedaría próximo al resto de Ala<sup>302</sup> y podría interaccionar con él.

### 1.2.3. OTROS MECANISMOS DE ACCIÓN

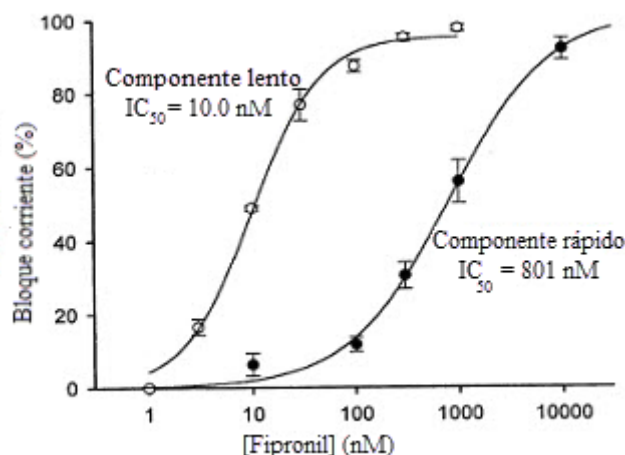
#### 1.2.3.1. Receptores de glutamato

Debido a que única y exclusivamente se encuentran en invertebrados (Cleland, 1996; Cully *et al.*, 1996; Horoszok *et al.*, 2001; Raymond y Satelle, 2002), los receptores de glutamato



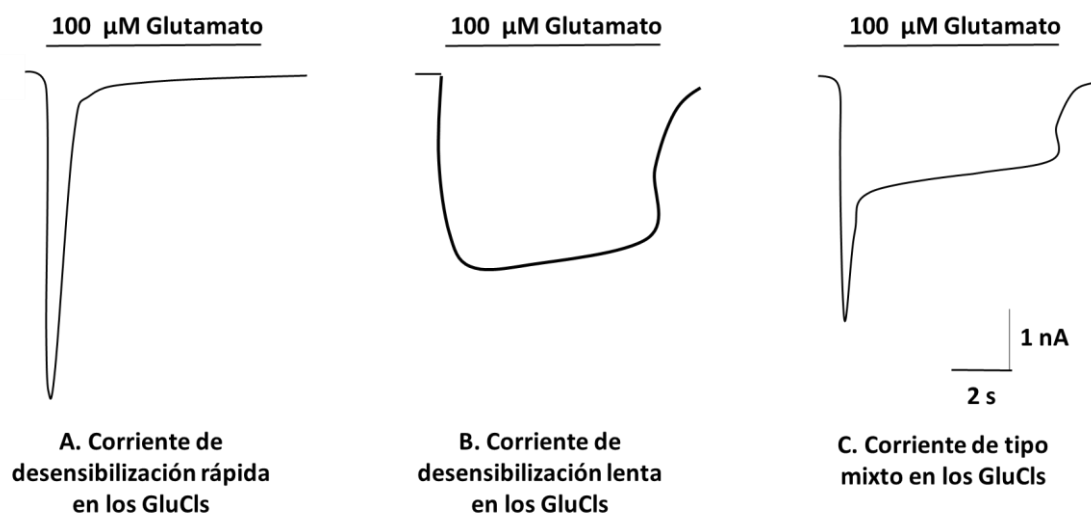
asociados a canales de  $\text{Cl}^-$  (GluCls) se consideran una buena diana para los insecticidas por proporcionar un alto grado de toxicidad selectiva en los insectos frente a los mamíferos. Del mismo modo que los receptores GABAérgicos ionotrópicos, los GluCls pertenecen a la superfamilia de receptores *Cys-loop*.

Aunque los resultados obtenidos, desde el punto de vista cuantitativo, no eran ni mucho menos comparables con la acción del fipronil sobre los receptores GABAérgicos ionotrópicos, el fipronil también es capaz de inhibir las acciones de los receptores GluCls (Cully *et al.*, 1994; Raymond *et al.*, 2000; Horoszok *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003). Se describieron inicialmente en las neuronas de los ganglios torácicos de cucarachas americanas (*Periplaneta americana*), dos tipos de receptores glutamatérgicos, los sensibles a la PTX y los no sensibles a la PTX (Ikeda *et al.*, 2003; Narahashi *et al.*, 2007). Análisis posteriores basados en la farmacología y en la cinética de los propios GluCls, indicaron dos grupos de receptores, y los llamaron “desensibilizantes” y “no desensibilizantes” (Zhao *et al.*, 2004a; Narahashi *et al.*, 2007). Ambos tipos de GluCls son sensibles tanto al glutamato como al ácido iboténico. Las corrientes desensibilizantes y no desensibilizantes se producen por iones de  $\text{Cl}^-$  en las neuronas, bien de forma separada o en combinación de ambas. También se vio que los GluCls pueden coexistir y funcionar independientemente de los canales de  $\text{Cl}^-$  activados por GABA. Los receptores GluCls “desensibilizantes” y “no desensibilizantes” poseen diferente sensibilidad a la PTX y al fipronil. Así, para el caso de los GluCls “desensibilizantes”, sólo un 8% se bloquearon por 100  $\mu\text{M}$  de PTX y un 56% por 1  $\mu\text{M}$  del fipronil mientras que los receptores GluCls “no desensibilizantes” se bloquearon de forma muy potente por la PTX con valores de  $\text{CI}_{50}$  de 4.1  $\mu\text{M}$  y para el caso del fipronil este bloqueo fue del 98% de los receptores. Por lo tanto, el fipronil va a inhibir los GluCls “no desensibilizantes” con una potencia mayor que los “desensibilizantes” (Zhao *et al.*, 2004b). La  $\text{CI}_{50}$  obtenida para los receptores “desensibilizantes” y “no desensibilizantes” fue de 801 y 10 nM, respectivamente (Figura 12). Esto va a indicar que los GluCls juegan un papel importante en la toxicidad del fipronil.



**Figura 12. Receptores de glutamato asociados a canales de  $\text{Cl}^-$ :** receptores “desensibilizantes” y “no desensibilizantes”.

Además, como se puede ver en la Figura 13, en los GluCl $\text{s}$  “desensibilizantes” el glutamato induce una corriente que aumenta rápidamente seguida de una fase rápida en la que recupera el potencial de partida de  $-60 \text{ mV}$ . Por el contrario, los GluCl $\text{s}$  “no desensibilizantes”, en contacto con el glutamato generan una corriente que aumenta lentamente y que a su vez va a recuperar el potencial de partida de forma lenta.



**Figura 13. Corrientes inducidas en los receptores de glutamato asociados a canales de  $\text{Cl}^-$ .**

### 1.2.3.2. Receptores de histamina

La histamina, que va a intervenir en la neurotransmisión de fotoreceptores de distintos artrópodos (Sarthy, 1991), posee receptores asociados a canales de  $\text{Cl}^-$  (HisCl) que, al igual que

los GluCl, pertenecen a la superfamilia *Cys-loop*. En un estudio publicado sobre la acción del fipronil en receptores de histamina de *Drosophila melanogaster* expresados en oocitos de *Xenopus*, se observa que los receptores HisCl1 e HisCl2 eran insensibles a concentraciones de 10  $\mu$ M de fipronil (Zheng *et al.*, 2002).

### ***1.3. ESPECTRO DE ACCIÓN Y USOS DEL FIPRONIL***

El fipronil es un insecticida y acaricida de amplio espectro:

- de uso agrícola, para aplicación al follaje o suelos (control de plagas en cultivos como el maíz),
- de uso pecuario, para el control de garrapatas y pulgas en perros y gatos, así como para el control de garrapatas, piojos y moscas en bovinos (antiparasitario externo),
- de uso urbano para el control de termitas subterráneas y cucarachas y
- de uso doméstico, siendo efectivo contra insectos resistentes o tolerantes a insecticidas piretroides, organofosforados y carbamatos.

#### **Uso agrícola del fipronil**

El 39% del fipronil comercializado se utiliza en la protección de los cultivos contra distintas plagas (Tingle *et al.*, 2003). Desde 1999 hasta la actualidad, la Sociedad de Entomología de los EE.UU. en su memoria anual de pruebas de control de artrópodos ha publicado numerosos informes acerca de la eficacia del fipronil sobre distintos tipos de cultivos, sobre todo maíz, arroz y algodón (Entomological Society of America, 1999-2016). En España se comercializa en dos presentaciones (Yagüe y Bolívar, 2002).

Con respecto al cultivo del algodón, el fipronil es muy eficaz contra el picudo o gorgojo del algodón *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) (Mulrooney *et al.*, 1998;

Mulrooney y Goli, 1999). Con el fin de conseguir eficacias del 100% se tiende a combinar el tratamiento químico con el de parasitoides. En el caso del fipronil existe el inconveniente de tener una importante toxicidad también contra el ectoparásito *Catolaccus grandis* (Enzen *et al.*, 2000).

Para el cultivo de arroz el fipronil es muy utilizado en el tratamiento de las semillas contra el gorgojo *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel (Coleoptera: Curculionidae) (Stevens *et al.*, 1999; Stout *et al.*, 2001), ya que parece no afectar la germinación de las semillas ni el crecimiento posterior de la planta (Stevens *et al.*, 1999). También ha demostrado ser efectivo contra el *Chironomus tepperi* Skuse (Diptera: Chironomidae) (Stevens *et al.*, 1998). Algunos autores han mostrado su preocupación por el efecto del fipronil y sus productos de descomposición sobre distintos organismos presentes en el medio acuático próximo a los cultivos de arroz (Chatton *et al.*, 2002; Key *et al.*, 2003; Volz *et al.*, 2003; Cary *et al.*, 2004; Chandler *et al.*, 2004). Estudios de laboratorio han demostrado que el fipronil y sus metabolitos (sulfona, sulfuro y destiofipronil) presentan una alta toxicidad para las especies *Procambarus clarkii* y *Procambarus zonangulus* (Schlenk *et al.*, 2001).

Aplicado sobre las semillas el fipronil se utiliza contra los trips, siendo eficaz frente a las especies *Thrips tabaci* Lindem (Thysanoptera: Thripidae) (Ester *et al.*, 1997), una plaga polífaga muy extendida que ataca a los cultivos como el algodón, tomates y, como su propio nombre implica, el tabaco; y *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) (Garzo *et al.*, 2000), el trip de las flores, que es una de las plagas más significativas de Europa ya que ataca a las hortalizas y a los cultivos ornamentales de invernaderos. En Australia se utiliza contra los trips que atacan plantas ornamentales (Tingle *et al.*, 2003).

El fipronil, seguido del piretroide deltametrina (Peveling *et al.*, 2003), es el insecticida que mayor se emplea para el control de plagas de langostas *Locusta migratoria capito* Saussure y *Nomadacris septemfasciata* Serville.

En cuanto a su uso frente a plagas que afectan al césped, el fipronil tiene la ventaja de tener muy baja toxicidad en lombrices de tierra que tienen un efecto beneficioso en la estructura, formación y ciclo de nutrición del suelo (Mostert *et al.*, 2002). En los EE.UU. es muy utilizado en los campos de golf (Tingle *et al.*, 2003).

### Uso pecuario del fipronil

En estudios de laboratorio el fipronil es eficaz contra mosquitos (Diptera: Culicidae) (Ali *et al.*, 1998, 1999; Kolaczinski y Curtis, 2001) y frente a otros dípteros como la mosca de la col *Delia readicum* (Diptera: Anthomyiidae) (Jukes *et al.*, 2001), la mosca *Lucilia sericata* Meigen (Diptera: Calliphoridae) (Smith *et al.*, 2000), que puede producir miasis traumáticas en animales, y la mosca de la fruta *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) (Abdallahi *et al.*, 2000).

El fipronil se utiliza en veterinaria como antiparasitario de uso externo por su acción insecticida y acaricida, sin que se haya demostrado que presente acción repelente (Mehlhorn *et al.*, 2001). Su uso se realiza por vía tópica y no por vía oral, ya que por esta vía el fipronil se metaboliza en metabolitos menos selectivos que él (Hainzl y Casida, 1996; Hainzl *et al.*, 1998). Se comercializa para el tratamiento de infestaciones por pulgas en gatos y perros, y garrapatas en perros. El fipronil se concentra en las glándulas sebáceas y ofrece una protección de dos meses contra las pulgas y de un mes contra las garrapatas (Chadwick, 1997). Sin embargo, no parece ser eficaz hasta pasada al menos una hora después de su aplicación (Franc y Cadiergues, 1998). En distintos estudios publicados en revistas científicas el fipronil ha demostrado ser eficaz, utilizando las concentraciones de las presentaciones comerciales, en la prevención y en el tratamiento de infestaciones por:

- *Trichodectes canis* (Phthiraptera: Trichodectidae), el piojo de los perros (Cooper y Penalliggon, 1996; Pollmeier *et al.*, 2002);

- *Felicola subrostratus* (Phthiraptera: Trichodectidae), el piojo de los gatos (Pollmeier *et al.*, 2004);
- *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae), la pulga común del gato, en gatos (Harvey *et al.*, 1997; Franc y Cadiergues, 1998; Hutchinson *et al.*, 1998; Dryden *et al.*, 2000; Ritzhaupt *et al.*, 2000a; Cadiergues *et al.*, 2001; Jacobs *et al.*, 2001; Payne *et al.*, 2001; Medlau *et al.*, 2002), en perros (Ritzhaupt *et al.*, 2000b; Cadiergues *et al.*, 2001; Mehlhorn *et al.*, 2001; Medlau *et al.*, 2003), en el ciervo del pantano (*Blastocerus dichotomus*) (Szabó *et al.*, 2000), en terneros (Araújo *et al.*, 1998) y en estudios *in vitro* (Zakson-Aiken *et al.*, 2000; Mehlhorn *et al.*, 2001);
- *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae), la pulga común del perro (Dryden *et al.*, 2000; Cadiergues *et al.*, 2001);
- *Oropsylla montana* (Siphonaptera: Ceratophyllidae), vector de la peste, en ardillas (Metzger y Rust, 2002);
- *Xenopsylla cheopis* (Siphonaptera: Pulicidae), pulga de la rata, vector principal de *Yersinia pestis* (Rajonhson *et al.*, 2017),
- Ácaros de la especie *Sarcoptes scabiei* var. *canis* (Acari: Sarcoptidae) en perros (Curtis, 1996);
- Garrapatas de las especies *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) (Davoust *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2003; Eiden *et al.*, 2015) y *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae), relacionado con la transmisión de la fiebre de las Montañas Rocosas (*Rickettsia rickettsii*) (Zheng *et al.*, 2003), en perros (Wallace *et al.*, 2000);
- *Cheyletiella* spp. (Acari: Cheyletiellidae) en perros (Chadwick, 1997);
- *Psoroptes cuniculi* (Acari: Psoroptidae) en conejos (Cutler, 1998);
- *Psoroptes* spp. (Acari: Psoroptidae) en alpacas (*Lama pacos*) (Frame y Frame, 2001);
- *Trombicula autumnalis* (Acari: Trombiculidae) en perros y gatos (Nuttall *et al.*, 1998); y,
- *Otodectes cynotis* (Acari: Psoroptidae) en perros y gatos (Vincenzi y Genchi, 1997).

En ganado vacuno, el fipronil en concentraciones del 1% ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de infestaciones por garrapatas de la especie *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) (Davey *et al.*, 1998).

### Uso urbano del fipronil

Se comercializa como cebo para el control de cucarachas (Dictyoptera: Blattellidae), presentando una persistencia superior a tres meses y siendo eficaz contra las ninfas y adultos de la cucaracha americana (*Periplaneta americana*) (Kaakeh *et al.*, 1997) y la cucaracha alemana (*Blattella germanica*) (Kaakeh *et al.*, 1997; Scott y Wen, 1997; Valles *et al.*, 1997; Silverman y Liang, 1999; Durier y Rivault, 2000a, 2000b; Wei *et al.*, 2001; Tilak *et al.*, 2002), observándose una baja resistencia cruzada en estirpes resistentes a insecticidas del grupo de los policlorocicloalcanos (Scott y Wen, 1997; Valles *et al.*, 1997), si bien en un estudio reciente Holbrook *et al.* (2003) han identificado estirpes de *Blattella germanica* que presentan una resistencia importante al fipronil (17 veces más resistente que las estirpes susceptibles).

El fipronil se comercializa como termicida en algunos países de África, en los EE.UU. y Australia (Tingle *et al.*, 2003), ya que es eficaz frente a las termitas subterráneas de la especie *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae), destructoras de la madera y otras materias vegetales (Ibrahim *et al.*, 2003; Shelton y Grace, 2003; Gautam *et al.*, 2014). Si bien su acción es lenta, el fipronil ha resultado eficaz en estudios de laboratorio frente a los hemípteros *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera: Reduviidae) y *Rhodnius neglectus* Lent (Hemiptera: Reduviidae), chinches que actúan como vectores de la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) en América Central y del Sur (Rojas de Arias y Fournet, 2002).

### Uso doméstico del fipronil

En algunos países el fipronil se comercializa como insecticida de uso doméstico para su utilización como cebo contra hormigas (Tingle *et al.*, 2003), siendo eficaz en estudios de laboratorio y de campo frente a especies que pueden ser plagas de los edificios como *Linepithema humile* (Hymenoptera: Formicidae) (hormiga argentina) (Hooper-Bui y Rust, 2000; Vega y Rust, 2003), *Tapinoma* spp. (Hymenoptera: Formicidae) (Ulloa-Chacón y Jaramillo, 2003; Scharf *et al.*, 2004) y *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) (hormiga de fuego u hormiga brava) (Collins y Callcott, 1998), esta última una plaga muy agresiva y abundante en los estados meridionales de los EE.UU., donde causa considerables daños a los cultivos de soja.

También se ha estudiado la posible utilización del fipronil en medicina humana contra la pediculosis causada por el piojo de la cabeza (*Pediculus humanus capitis* De Geer) (Phthiraptera: Pediculidae). Sin embargo, se ha observado una baja eficacia (Downs *et al.*, 1999, 2000).

### ***1.4. ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN, EXCRECIÓN Y METABOLISMO DEL FIPRONIL***

Según los últimos estudios utilizados para la evaluación del fipronil como sustancia activa de productos biocidas (ECHA, 2011), se ha descrito que el fipronil se absorbe amplia y rápidamente; más del 80% en menos de 72 horas. El mayor residuo que se encuentra en los tejidos animales es la sulfona o el MB 46136. Su excreción se produce sobre todo vía fetal (más del 70% en 7 días), pero también por vía urinaria (6-26%) y vía biliar (7-18%).

En un estudio confidencial (Powles, 1992), remitido por el laboratorio Rhone-Poulenc a la Agencia para la Protección del Medio Ambiente de los EE.UU. (EPA) (USEPA, 1996a) y a la Organización Mundial de la Salud (OMS) (JMPR, 1998) se describe que ratas Sprague-Dawley tratadas por vía oral con [<sup>14</sup>C]-fipronil disuelto en solución de

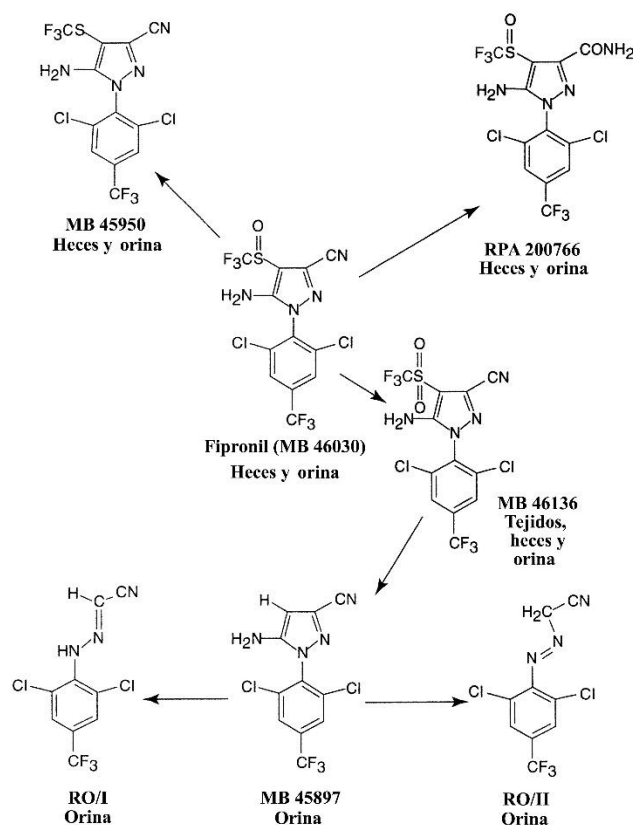


carboximetilcelulosa al 0,5% p/v y Tween 80 al 0,01% p/v, presentaban a los 7 días de tratamiento radiactividad residual principalmente en el tejido adiposo abdominal y en menor medida en hígado, glándulas suprarrenales, páncreas, piel, riñón, músculo, tiroides, así como en el ovario y en el útero de las ratas hembra. Un 45-70% de la dosis administrada se detectaba en heces, lo que indica que esta vía de excreción es importante en la administración oral, y sólo un 5-25% en orina. No se observaban diferencias de sexo en la excreción y se identificaron distintos tipos de metabolitos (Figura 14). El principal metabolito en tejidos, sobre todo en tejido graso, así como en hígado, riñón y músculo fue el MB 46136 (sulfona). En las heces predominaba el fipronil acompañado de tres metabolitos: MB 46136 (sulfona), MB 45950 (sulfuro) y, en menor cantidad, RPA 200766 (amida), lo que sugiere que existe una eliminación biliar del fipronil absorbido una vez metabolizado, así como una eliminación directa del fipronil no absorbido. En la orina los principales metabolitos eran el MB 46136 (sulfona), RPA 200766 (amida), MB 45897, MB 45950 (sulfuro), RO/I y RO/II.

Hainzl y Casida (1996) estudiaron el metabolismo del fipronil en ratones Swiss Webster albinos machos a los que se les administró por vía intraperitoneal (i.p.) usando como vehículo DMSO. El único metabolito que se identificó fue la sulfona, que estaba presente en encéfalo, hígado, riñón, tejido graso y heces. En un estudio posterior (Hainzl *et al.*, 1998), se observaba que el nivel de fipronil y su sulfona en el encéfalo aumentaba en función de la dosis (10-40 mg/kg p.c.) administrada por vía i.p., no existiendo correlación entre la mortalidad y los niveles encontrados en el SNC.

La aplicación de [<sup>14</sup>C]-fipronil por vía tópica en la región interescapular en perros Beagle (12 meses y 12 kg de p.c.) en dosis de 12 mg/kg p.c. permitía que el fipronil se siguiese detectando 56 días después en la zona de aplicación en el cuello y en la zona lumbar. En este estudio se observó que el fipronil se distribuía en el estrato corneo, en la epidermis y, sobre todo, en las glándulas sebáceas de las capas epiteliales. No se detectó radiactividad en las capas dérmicas o

hipodérmicas, indicando una baja capacidad de distribución sistémica del fipronil por vía percutánea (Cochet *et al.*, 1997). Por otra parte, estudios *in vitro* en plasma de perro Beagle indican que el fipronil y su sulfona se unen a proteínas plasmáticas con un porcentaje de fijación del 97,17-97,90% y 98,73-99,10%, respectivamente (Birckel *et al.*, 1997). Estos porcentajes se mantenían constantes en todo el rango de concentraciones estudiadas (0,1-2,0 µg/mL).



**Figura 14. Principales metabolitos del fipronil en la rata.**

La incubación del fipronil con microsomas hepáticos humanos (Caboni *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2004) o microsomas del hígado de rata o conejo (Dupuy *et al.*, 1997) y distintas isoformas del citocromo P450 (CYP) indican que la sulfona del fipronil es su principal metabolito por oxidación vía CYP (Caboni *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2004). El CYP3A4 es el principal responsable de la metabolización del fipronil, mientras que la isoforma CYP2C19 es menos activa (Tang *et al.*, 2004). La actividad de la CYP3A4 *in vitro* requiere la co-expresión del citocromo b<sub>5</sub> (b<sub>5</sub>), que

es más eficaz que la adición de cantidades exógenas equivalentes de b<sub>5</sub>. Quizás la co-expresión permite la mejor integración del b<sub>5</sub> con el CYP3A4 en las membranas microsomales.

### Metabolismo en suelo y agua

El fipronil se degrada lentamente en el suelo por acción de la luz ( $t_{1/2}$ >34 días) dando lugar a tres metabolitos no volátiles: RPA 200766, MB 46513 y RPA 104615 (USEPA, 1996a; Mulrooney *et al.*, 1998). El MB 46513 resulta de la acción directa de la luz sobre el fipronil, mientras que el RPA 104615, procede de la acción de la luz sobre la sulfona que se forma por oxidación del fipronil (Ngim *et al.*, 2000). En condiciones aerobias los microorganismos presentes en el suelo degradan lentamente el fipronil ( $t_{1/2}$  = 34-308 días, varía con la composición del suelo y la temperatura), dando lugar a RPA 200766 como metabolito mayoritario (USEPA, 1996a; JMPR, 2002; EFSA, 2006; ECHA, 2011). Tanto el fipronil como sus metabolitos tienen escasa movilidad en el suelo y tienden a quedar retenidos en los 10-12 cm superiores del suelo, de ahí que el riesgo de contaminación de aguas profundas sea escaso (USEPA, 1996a).

El fipronil es estable a temperatura ambiente durante un año en ausencia de iones metálicos. Si se almacena durante un día a 100°C o bien siete días a 50°C su descomposición es inferior al 0,5%, dando lugar a metabolitos no volátiles (Belayneh, 1998). Estudios de laboratorio del fipronil realizados bajo condiciones aeróbicas indican que es de moderado a altamente persistente en suelo; parte del fipronil se degrada por fotólisis y parte es adsorbido, dando lugar a un proceso de degradación biótico muy lento (USEPA, 1996a; ECHA, 2011). Los distintos metabolitos que se producen se reflejan en la Figura 15.

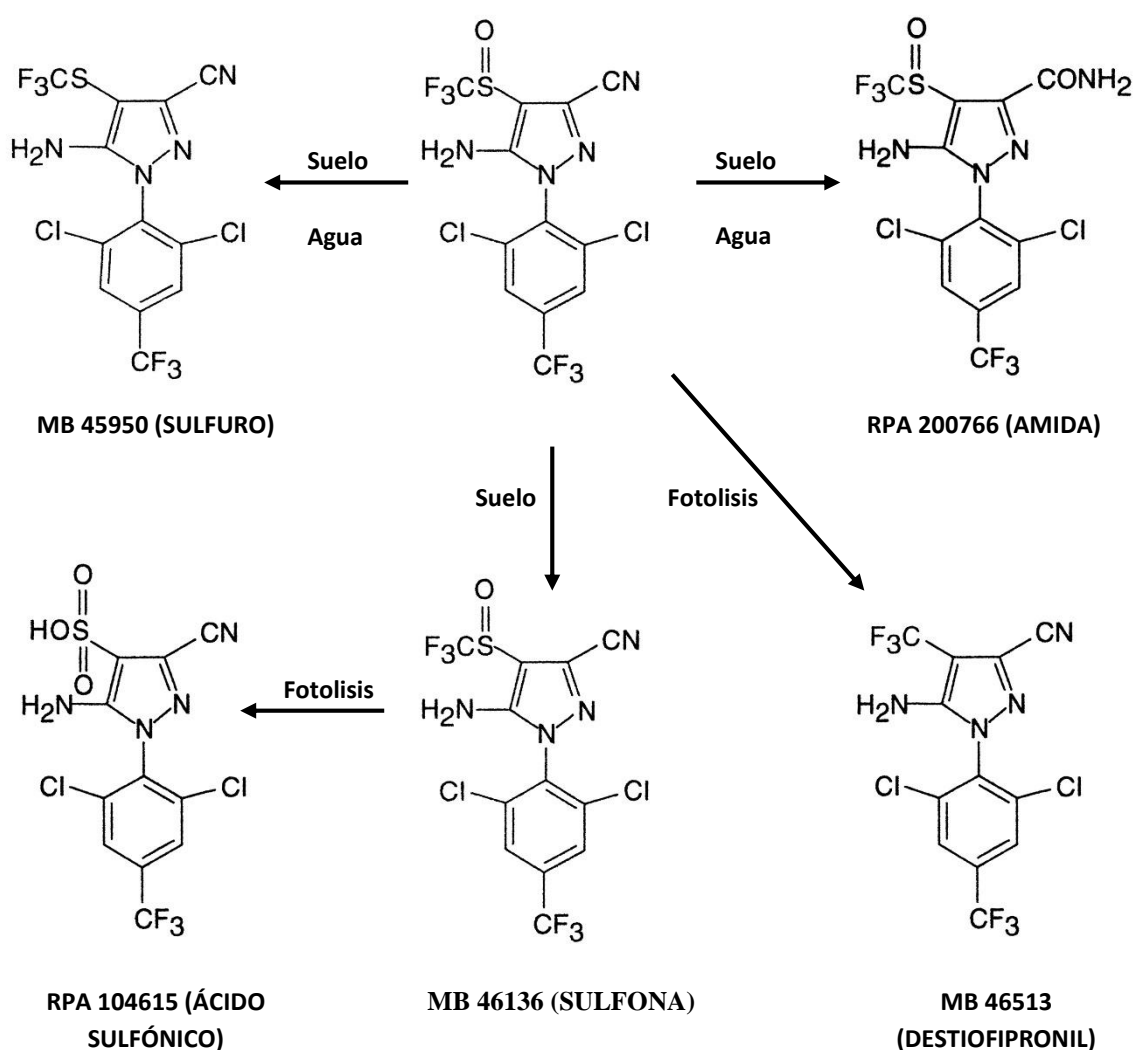
En estudios de laboratorio con distintos tipos de suelo se observa que la adsorción del fipronil está relacionada con el contenido en materia orgánica, de manera que se obtienen mayores coeficientes de adsorción de Freundlich ( $K_f$ ) cuando el contenido en materia orgánica es mayor (Bobé *et al.*, 1997; Ying y Kookana, 2001). También se observa que el  $K_f$  del fipronil aumenta a

medida que disminuye la razón suelo/agua. Esto podría deberse a que la presencia de agua favorece la desagregación de las partículas en el suelo, aumentando así la superficie de adsorción. El aumento de temperatura entre 22°C y 35°C también incrementa el  $K_f$  y se observa un cambio en el mecanismo de interacción entre la matriz del suelo y el fipronil, de manera que al aumentar la temperatura, las interacciones pasan a ser mayoritariamente de tipo polar, sobre todo hidrofóbicas.

En el agua, el fipronil es estable a la hidrólisis con valores de pH ligeramente ácidos o neutros. Por el contrario, el aumento de pH aumenta su hidrólisis. A pH 9, la  $t_{1/2}$  del fipronil es de 28 días y el principal metabolito que se observa es el RPA 200766 (USEPA, 1996a; ECHA, 2011). En el agua el fipronil también sufre fotodegradación. Al exponer fipronil (grado técnico) en agua a una luz de xenón en el laboratorio se obtuvo una  $t_{1/2}$  de 3,63 horas. Los principales metabolitos identificados fueron el MB 46513 y el RPA 104615. La degradación anaerobia es lenta ( $t_{1/2} > 100$  días) y los principales metabolitos identificados son el MB 45950 y el RPA 200766. Hay datos que indican que el fipronil puede acumularse en peces cuando éstos son expuestos a concentraciones altas durante 35 días (USEPA, 1996a).

### **Metabolismo en plantas**

En cuanto a la metabolización en plantas, los niveles de metabolitos varían en función de si el fipronil se aplica en suelo o se realiza una aplicación foliar (JMPR, 2002). Tras la aplicación de fipronil en el suelo se observa que los principales metabolitos identificados son, además del propio fipronil, el MB 46136 (sulfona) y, en muy bajos niveles, el MB 45950 (sulfuro). Si se realiza una aplicación foliar se observa la presencia del fipronil sin metabolizar, destiofipronil (MB 46513), la sulfona (MB 46136), y el sulfuro (MB 45950).



**Figura 15. Degradación del fipronil en el ambiente.** Los principales metabolitos son: la sulfona MB 46136 (uno de los principales productos de degradación aerobia en suelos); el sulfuro MB 45950 (importante en la degradación anaerobia acuática y en pequeñas cantidades en la degradación aeróbica en el suelo); la amida RPA 200766 (un producto importante en la fotolisis y en la degradación aerobia en suelos, así como en la degradación anaerobia en el agua); el destiofipronil (MB 46513) (principal producto de la fotolisis en agua y menor en la fotolisis en suelos); y el ácido sulfónico RPA 104615 (sólo en pequeñas cantidades por fotolisis en agua y suelo).

## ***1.5. TOXICIDAD DEL FIPRONIL EN MAMÍFEROS***

### **Toxicidad aguda**

Los últimos datos descritos (ECHA, 2011) acerca del fipronil demuestran que es tóxico tanto si se administra por vía oral ( $DL_{50}$ = 92 mg/kg en ratas macho), por vía dérmica ( $DL_{50}$ = 354 mg/kg medido en hembras de conejo) como por vía inhalatoria ( $CL_{50}$ = 0,36 mg/kg en ratas macho tras 4h de exposición). Por ello, el fipronil se clasifica con las indicaciones de peligro H301, H311 y H331 dentro de la clase de peligro “toxicidad aguda categoría 3” (ECHA, 2017). Los signos clínicos en la toxicidad aguda se caracterizan por la aparición de temblores y convulsiones clónico-tónicas previas a la muerte del animal.

Los valores de  $DL_{50}$  para los distintos metabolitos del fipronil descritos (EFSA, 2006), se indican a continuación:

- MB 45950 (sulfuro): Para ratas macho adultas, se ha descrito una  $DL_{50}$  por vía oral de 69 mg/kg, y una  $DL_{50}$  por vía dérmica de entre 500 y 4000 mg/kg. MB 45950 no es irritante a nivel cutáneo ni ocular en los conejos.
- MB 45897: No es tóxico ni tras administración oral ni percutánea ( $DL_{50}$  > 2000 mg/kg). Tampoco es irritante para la piel ni para los ojos.
- MB 46136 (sulfona): Presenta una  $DL_{50}$  por vía oral de 184mg/kg y por vía dérmica > 2000 mg/kg. No es irritante para la piel ni los ojos en conejos.
- RPA 200766 (amida): Posee una  $DL_{50}$  por vía oral > 2000 mg/kg.
- MB 46513 (destiofipronil): Presenta un comportamiento toxicocinético similar al fipronil. Es muy tóxico por vía oral ( $DL_{50}$ = 16 mg/kg), pero no es tóxico por vía dérmica ( $DL_{50}$ > 2000 mg/kg).
- RPA 105048: Posee una moderada toxicidad oral aguda ( $DL_{50}$ = 467 mg/kg).

### **Toxicidad local**

Conforme a los criterios de clasificación de la U.E. y del GHS, el fipronil no es irritante para la piel ni para los ojos en los test llevados a cabo en conejos, carece de potencial irritante respiratorio así como de potencial sensibilizante respiratorio y es un sensibilizador débil de la piel en los tests de Magnusson y Klignam, llevados a cabo en cerdos guineanos (ECHA, 2011).

### **Genotoxicidad**

La genotoxicidad de una sustancia se refiere a su capacidad para causar daño en el material genético. Este daño puede ser de tipo mutágeno o carcinógeno (IUPAC, 1993). Se han llevado a cabo 5 estudios *in vitro* y 3 estudios *in vivo* para investigar el potencial genotóxico del fipronil. A la vista de los resultados, los expertos consideran que el fipronil no es genotóxico (ECHA, 2011).

### **Toxicidad a largo plazo (Toxicidad subcrónica y crónica)**

Los ensayos de toxicidad subcrónica o de dosis repetidas son aquellos que estudian los efectos producidos por una sustancia cuando se administra de forma repetida o continua durante un corto período de tiempo, normalmente el 10% de la vida del animal. Cuando la exposición es más prolongada se habla de toxicidad crónica (IUPAC, 1993).

Los efectos a largo plazo del fipronil se evaluaron en un estudio de 2 años en ratas y en un estudio de 18 meses en ratones. En el estudio en ratas (Aughton, 1993), los efectos se observaron en el hígado, tiroides y en riñón. También se observó una incidencia de episodios convulsivos relacionada con la dosis. A dosis bajas se observan efectos leves sobre el T4 circulante y el colesterol, pero considerados como no toxicológicamente relevantes. Se observó una inducción de tumores tiroideos a dosis altas que probablemente son inducidos por el aumento

del aclaramiento de T4 en la bilis, en lugar de un efecto directo, y que son específicos en las ratas y por tanto no se consideró relevante para el hombre. El NOAEL (nivel sin efecto adverso observable) en este estudio fue 0,019 mg/kg p.c./día.

En un estudio con ratones (Broadmeadow, 1993), el NOAEL propuesto fue de 0,05 mg/kg p.c./día. En este estudio el punto crítico fue una disminución de la ganancia de peso, un aumento de peso del hígado y un aumento de la incidencia de vacuolización microvesicular de los hepatocitos (principalmente en los ratones machos). No se observó evidencia de carcinogenicidad.

El estudio de Aughton (1993) tiene cierta relevancia ya que ha sido utilizado para establecer la dosis de referencia aguda (RfD) y, posteriormente, por el Comité Conjunto de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) y de la OMS para la Evaluación de Residuos de Pesticidas (JMPR) para establecer la ingesta diaria admisible (IDA) del fipronil. A partir del valor de NOAEL obtenido en este estudio y utilizando un factor de incertidumbre de 100 el Comité de Revisión de RfD de los EE.UU., estableció una RfD de 0,0002 mg/kg p.c./día (USEPA, 1996a). Posteriormente, el JMPR (1998) utilizando también el NOAEL de este estudio y un factor de seguridad de 100 estableció una IDA de 0-0,0002 mg/kg p.c.

### **Toxicidad a largo plazo y carcinogenicidad**

El fipronil no se considera un compuesto carcinogénico. En ratas, la exposición al fipronil durante 89/91 semanas, ha dado lugar a una mayor incidencia de tumores de tiroides a dosis de 300 ppm, equivalentes a 12,68 y 16,75 mg/kg peso corporal/día en machos y hembras (Aughton, 1993). Sin embargo se conoce que las ratas son especialmente sensibles a generar este tipo de tumor. Estudios adicionales han sugerido que los tumores de tiroides de rata son inducidos por un



mecanismo que no es relevante para los seres humanos (tumores de células foliculares de tiroides debido a un mecanismo no genotóxico específica de rata), por lo tanto, se concluyó que el fipronil probablemente no es un compuesto carcinógeno para el hombre (EFSA, 2006; ECHA, 2017).

### **Toxicidad para la reproducción y el desarrollo**

Los ensayos de toxicología para la reproducción se refieren al estudio de los efectos adversos no hereditarios de las sustancias sobre el embrión, feto, neonato y mamífero prepúber, así como sobre los sistemas reproductor y endocrino del adulto (IUPAC, 1993).

En un estudio de toxicidad crónica y de toxicidad para la reproducción de dos generaciones, 30 ratas CD macho y 30 ratas CD hembra (generación F<sub>0</sub>) se trataron con 0; 3; 30; ó 300 ppm de fipronil grado técnico (pureza 95,4%) por vía oral (equivalentes a 0; 0,25; 2,5; ó 26 mg/kg p.c./día en machos y a 0; 0,27; 2,7; ó 28 mg/kg p.c./día en hembras) (King, 1992). Esta generación F<sub>0</sub> se apareó dos veces para producir las generaciones F<sub>1a</sub> y F<sub>1b</sub>. La generación F<sub>1a</sub> se apareó para producir la generación F<sub>2</sub>. En cuanto a la toxicidad crónica, tratamientos orales de 30 ppm y superiores dieron lugar a un aumento en el peso del tiroides e hígado en las generaciones F<sub>0</sub> y F<sub>1</sub>, a una disminución del peso de la pituitaria en las hembras de la generación F<sub>1</sub> y a una elevada incidencia de hipertrofia de células foliculares en hembras de la generación F<sub>1</sub>. Tratamientos orales de 300 ppm dieron lugar a una elevada mortalidad en las generaciones F<sub>0</sub> y F<sub>1</sub>, con signos clínicos que incluían sobre todo convulsiones. Además, con esta dosis, la generación F<sub>0</sub> presentó una disminución en el consumo de alimento antes del apareamiento, mientras que las generaciones F<sub>0</sub> y F<sub>1</sub> y las hembras de la generación F<sub>0</sub> (durante la gestación y la lactancia) mostraron una disminución en la ganancia de peso antes del apareamiento. El valor del NOAEL (toxicidad crónica) fue de 3 ppm, equivalente a 0,25 mg/kg p.c./día y el del LOAEL (toxicidad crónica) de 30 ppm, equivalente a 2,5 mg/kg p.c./día.

En cuanto a la toxicidad para la reproducción, con el tratamiento oral de 300 ppm se observó una elevada incidencia de convulsiones en las camadas F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> (al nacer y empezar el tratamiento con fipronil), una disminución en el número y peso de las camadas, y una disminución en el índice de fertilidad de la generación F<sub>1</sub>. Por tanto, el NOAEL (toxicidad para la reproducción) se estableció en 30 ppm, equivalente a 2,5 mg/kg p.c. y el LOAEL (toxicidad para la reproducción) en 300 ppm, equivalente a 25 mg/kg p.c./día.

En un estudio, se trataron ratas Wistar con una formulación comercial de fipronil al 10% por vía tópica (dosis única) en la región cervical con el fin de observar los efectos adversos sobre la reproducción (Ohi *et al.*, 2004). Las ratas hembra tratadas con 70 mg/kg p.c. durante la fase de proestro presentaron niveles aumentados de progesterona y disminuidos de estradiol a las 96 horas posteriores al tratamiento, cuando se compararon con el grupo control. Además, el fipronil aumentó el tiempo del ciclo estral de forma dosis-dependiente y, si bien el tiempo de gestación no fue afectado y no se observaron anomalías significativas en el desarrollo del feto, la ganancia de peso disminuyó durante la gestación.

La toxicidad para el desarrollo se refiere al estudio de los efectos adversos de los tóxicos sobre el desarrollo de los organismos (anomalías estructurales, alteración del nacimiento, deficiencias funcionales o muerte) como consecuencia de la exposición de cada progenitor antes de la concepción, o durante los períodos pre- y postnatal, hasta la maduración sexual (IUPAC, 1993). Se habla de embriotoxicidad cuando se refiere a la capacidad de una sustancia para producir efectos tóxicos en la progenie durante el primer período de la preñez, desde la concepción hasta el estado fetal. Estos efectos pueden incluir malformaciones, disfunciones, alteraciones del crecimiento, muerte prenatal y funciones postnatales alteradas. La teratogenicidad es un caso particular de la embriotoxicidad, demostrada por la producción o el incremento de la frecuencia de malformaciones estructurales, congénitas, no-hereditarias, en la progenie, visualmente detectables al nacimiento. La baja o nula actividad enzimática microsomal

en los fetos y recién nacidos es uno de los motivos que hacen que sean más susceptibles que los adultos a determinados xenobióticos (Hodgson y Levi, 2001).

En dos estudios de teratogenicidad por vía oral en ratas (Brooker y John, 1991) y conejos (King, 1990), el fipronil no indujo efectos adversos en el feto. El único efecto observado fue la reducción de la ganancia de peso corporal. El NOAEL de toxicidad maternal fue 4 y 0,2 mg/kg p.c./día para ratas y conejos, respectivamente. El NOAEL para los efectos del desarrollo, fue 20 y 1 mg/kg p.c./día para ratas y conejos, respectivamente.

Por tanto, con los datos disponibles se considera al fipronil como un compuesto no tóxico para la reproducción y no se considera como una sustancia teratogénica (ECHA, 2017).

### **Neurotoxicidad**

Se ha demostrado que el fipronil es neurotóxico en todas las especies estudiadas tanto en estudios de toxicidad de dosis repetidas como en estudios de administración única. Los síntomas clínicos observados están relacionados con el modo de acción del fipronil sobre el canal de cloro GABA-dependiente del sistema nervioso central y periférico. Estudios específicos de neurotoxicidad han demostrado que la neurotoxicidad del fipronil es de naturaleza farmacológica y la exposición repetida no conlleva cambios histopatológicos en el cerebro u otras partes del sistema nervioso (Gill *et al.*, 1993; Hughes, 1997).

En rata el NOAEL elegido es 2,5 mg/kg p.c./día en base a un estudio de neurotoxicidad aguda. El punto crítico fue efectos de extensión reducida de las patas traseras, efecto observado 7 horas después del tratamiento, a las dosis más elevadas de 5 y 7,5 mg/kg de peso corporal (Gill *et al.*, 1993; Hughes, 1997).

### Toxicidad en el hombre

Actualmente la OMS (WHO, 2001) clasifica al fipronil en el grupo de las sustancias “moderadamente peligrosas” (clase II) para el hombre, que incluye aquellas sustancias que en grado técnico presentan un valor de  $DL_{50}$  (rata) por vía oral en estado sólido o líquido de 50-500 mg/kg p.c. ó 200-2000 mg/kg p.c., respectivamente, o un valor de  $DL_{50}$  (rata) por vía dérmica en estado sólido o líquido de 100-1000 mg/kg p.c. ó 400-4000 mg/kg p.c., respectivamente. Su inclusión en este grupo se basa en que el fipronil (grado técnico) tiene un valor de  $DL_{50}$  (vía oral) en rata de 92 mg/kg p.c. Por los efectos cancerígenos descritos en el apartado anterior la EPA clasifica el fipronil en el grupo C (“probablemente carcinógeno para el hombre”).

En 1996 se dieron 59 casos de afecciones oculares, dérmicas, respiratorias y gastrointestinales, todas ellas leves y reversibles, que probablemente pudieron ser debidas a la exposición a fipronil dispersado mediante sistemas de aerosolización (Tingle *et al.*, 2003). Se ha demostrado la capacidad del fipronil de absorberse a través de la piel del hombre en su contacto con animales que han sido tratados con una preparación comercial de fipronil al 9,8 % (p/p) (Jennings *et al.*, 2002). Sin embargo, se conoce que el fipronil penetra pobremente a través de la piel humana, con una velocidad de flujo de 0,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  (Tingle *et al.*, 2003). Los nativos de Madagascar suelen consumir langostas, muchas veces sin un control de presencia de insecticidas como el fipronil (Dinham, 2000). Tampoco a día de hoy, se han publicado estudios de epidemiología ocupacional y ambiental, de este producto insecticida. En la literatura científica únicamente tres trabajos han descrito casos de exposición a fipronil. El primero, en 2003, es el caso de una mujer de 77 años, con problemas de visión, que ingirió un producto comercial de fipronil, al confundirlo con una galleta (Fung *et al.*, 2003). La pieza ingerida pesaba 1,4 gramos y contenía 0,01%, de fipronil, por lo que la cantidad de fipronil ingerido fue de 0,14 mg. Fue ingresada 9 horas después de la ingestión y durante dos semanas no se observaron signos clínicos de intoxicación y el examen hematológico, así como los análisis de la función renal y hepática, fueron normales. El segundo trabajo, data en 2004, fue el de un hombre de 50 años que dos horas

después de haber preparado y fumigado con una solución de fipronil, sin protección de las vías respiratorias ni de la piel, sufrió dolor de cabeza, náuseas, vértigo y debilidad (Chodorowski y Anand, 2004). No se observaron signos clínicos agudos de intoxicación y los síntomas desaparecieron espontáneamente 5 horas después de la exposición. En el seguimiento posterior tampoco se observaron efectos a medio-largo plazo. En un trabajo reciente, también de 2004, y a diferencia de los dos anteriores, sí se observaron signos de intoxicación aguda en dos de los siete intentos de suicidio utilizando Regent 50 SC® (fipronil al 4,95% en propilénglicol), trabajo descrito por Mohamed *et al.* (2004). Estos dos pacientes presentaron sudoración excesiva, náuseas, vómitos y convulsiones clónico-tónicas que desaparecieron de forma espontánea. Ambos casos se trataron satisfactoriamente con diazepam. En los siete casos descritos no se observó ningún tipo de complicación posterior. Se concluye que el tratamiento de las intoxicaciones por fipronil debe basarse en una descontaminación digestiva inmediata y un tratamiento de soporte y sintomático, a falta de un tratamiento con antídotos.

El derivado sulfona del fipronil (metabolito en mamíferos y producto de degradación en el suelo) y el destiofipronil (principal producto de descomposición por fotólisis en suelo y agua) presentan una toxicidad igual o superior, respectivamente, a la del propio fipronil. Además, presentan menor selectividad por los receptores GABAérgicos de insectos, con respecto a los receptores de los mamíferos. Por estos motivos en 1997, el Joint Meeting of Experts on Pesticides Residues (JMPR, 1998) a la vez que establecía una IDA para el fipronil (0,0002 mg/kg p.c.) estableció también una IDA temporal de 0,00003 mg/kg p.c. para el destiofipronil. De la misma manera, establecieron una RfD de 0,003 mg/kg p.c. tanto para el fipronil como para el destiofipronil, basándose en el estudio confidencial de Dange (1994b) y aplicando un factor de seguridad de 100.

Posteriormente, el JMPR (2002) estableció una IDA conjunta de 0,0002 para el fipronil y el destiofipronil y confirmaron la RfD. También se estimaron los límites máximos de residuos (LMRs), teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- el fipronil es el principal residuo presente en las plantas y es el residuo utilizado para establecer el LMR en productos vegetales;
- la suma del fipronil y el metabolito sulfona (MB 46136), expresada como fipronil, es el residuo-marcador utilizado para determinar el LMR en productos de origen animal;
- para la estimación de la ingesta aguda o crónica, tanto de productos de origen animal como vegetal, el residuo-marcador utilizado para establecer el LMR es la suma de fipronil, la sulfona (MB 46136), el destiofipronil (MB 46513) y el sulfuro (MB 45950), expresada como fipronil.

Finalmente, la EPA también estableció valores de LMR en productos alimenticios, considerando como residuo-marcador la suma de fipronil, la sulfona, el destiofipronil y el sulfuro.

### ***1.6. TOXICIDAD DEL FIPRONIL EN EL MEDIO AMBIENTE ACUÁTICO***

Uno de los principales riesgos de la utilización del fipronil como insecticida está en su elevada ecotoxicidad; el fipronil puede dar lugar a efectos adversos inmediatos o agudos así como efectos a largo plazo en el medio ambiente debido a la bioacumulación o a los propios efectos tóxicos del fipronil en los diferentes compartimentos biológicos (acuático, atmosférico, terrestre y sedimento). En el caso de la toxicidad del compartimento acuático, ésta se basa principalmente en los estudios en tres grupos taxonómicos: peces, insectos o invertebrados y plantas acuáticas o algas, llevados a cabo siguiendo las directrices de la OECD.

Es importante para el caso del fipronil, la elevada toxicidad observada en diversos estudios a nivel terrestre con respecto a las abejas (Unión Europea, 2002; Infoagro, 2004; EFSA, 2013). En el dossier de evaluación del fipronil como producto insecticida presentado por la ECHA en 2011, hay un estudio de toxicidad aguda por contacto sobre abejas (*Apis mellifera*), que produjo

una  $DL_{50}$  de 0,00593  $\mu\text{g}/\text{abeja}$ , y una toxicidad aguda oral fue de  $DL_{50} = 0,00417 \mu\text{g}/\text{abeja}$  (ECHA, 2011).

A continuación, se resumen los efectos ecotoxicológicos sobre distintos grupos taxonómicos acuáticos, que podrían utilizarse para valorar por extrapolación los potenciales efectos sobre un amplio espectro de receptores.

### **Toxicidad aguda y crónica para los peces**

La toxicidad aguda del fipronil para juveniles de *Lepomis macrochirus* fue estudiada en condiciones de laboratorio durante 96 horas de exposición de flujo continuo. La concentración letal 50 ( $CL_{50}$ ) se calculó en 85,2  $\mu\text{g}/\text{L}$ . La toxicidad crónica del fipronil en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) fue investigada durante una exposición de 90 días de flujo continuo. La concentración sin efecto adverso observable (NOEC) fue de 15  $\mu\text{g}/\text{L}$  (ECHA, 2011). Estos datos indican una toxicidad moderada del fipronil en peces.

### **Toxicidad aguda y crónica para los invertebrados**

*Daphnia magna* es la especie de elección para el estudio de los invertebrados acuáticos en agua dulce. Sin embargo, las Daphnias son menos sensibles al fipronil que otros invertebrados, particularmente los insectos. Por lo tanto, las pruebas con fipronil se han llevado a cabo en otras especies de invertebrados acuáticos, incluyendo insectos. La toxicidad aguda del fipronil al insecto se estudió en un ensayo de laboratorio de 96 h. El valor de la  $CL_{50}$  a 96 h derivado de este estudio se calculó en 0,14  $\mu\text{g}/\text{L}$ . El valor de toxicidad crónico de días más bajo se estableció así mismo para *Mysidopsis bahía* con un NOEC de 0,0077  $\mu\text{g}/\text{L}$  (ECHA, 2015). Estos estudios, sugieren que el fipronil es extremadamente tóxico para los invertebrados.

## Toxicidad de las plantas acuáticas

La actividad del fipronil en algas se midió en un estudio de laboratorio de 96 h utilizando *Scenedesmus subspicatus*. El  $C_{50}E_b$  se determinó en 68  $\mu\text{g/L}$ . El NOErC fue 40  $\mu\text{g/L}$ . La toxicidad del fipronil en *Lemna gibba* se estudió en el laboratorio en un ensayo de toxicidad de 14 días. No hubo efecto en la concentración probada. Por lo tanto, la  $CE_{50}$  en un estudio de 14 días en *Lemna gibba* es  $> 0,081 \text{ mg/L}$  y el NOEC fue de 0,081  $\text{mg/L}$  (ECHA, 2011).

Especie	Taxón representado	Criterio de valoración (Endpoint)	Concentración media
<i>Lepomis macrochirus</i>	Peces de agua dulce y fase acuática de anfibios	LC <sub>50</sub> (96 horas)	85,2 µg/L
<i>Oncorhynchus mykiss</i>		NOEC(28 días)	15 µg/L
<i>Mysidopsis bahia</i>	Invertebrados marinos y de estuario	EC <sub>50</sub> (96 horas)	0,14 µg/L
		NOEC (28 días)	0,0077 µg/L
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Plantas acuáticas y algas	C <sub>50</sub> E <sub>b</sub> (96 horas)	68 µg/L
		NOErC (96 horas)	40 µg/L
<i>Lemna gibba</i>		C <sub>50</sub> E (14 días)	> 0,081 mg/L
		NOEC (14 días)	0,081 mg/L

**Tabla 10. Datos de toxicidad del fipronil en estudios ecotoxicológicos en organismos acuáticos (ECHA, 2011 y 2015).**

## 1.7. OBJETIVO DEL TRABAJO

La mayoría de los trabajos publicados sobre el fipronil se centran en su mecanismo de acción a nivel del canal ionotrópico del receptor GABAérgico (Tingle *et al.*, 2003). Hasta el momento se apunta al fipronil como un potente bloqueante del receptor GABAérgico asociado a canales de  $\text{Cl}^-$ , con más selectividad sobre los receptores de insectos que sobre los receptores de mamíferos (Zhao *et al.*, 2003; Narahashi *et al.*, 2007; Narahashi *et al.*, 2010). Sin embargo, otros posibles modos de acción a nivel de otros sistemas de neurotransmisores podrían estar también implicados. Hay que tener en cuenta que el fipronil es una molécula muy reactiva, al igual que el resto de fenilpirazoles, ya que el anillo pirazólico presenta una elevada densidad de electrones en orbitales  $\pi$ , siendo el enlace N-N el más débil del anillo. Se conoce la formación de muchos



complejos de anillos aromáticos pirazólicos con metales (Eicher *et al.*, 2004; Panteleev *et al.*, 2015). La formación de estos complejos con iones que actúan como coenzimas o cofactores enzimáticos podrían alterar múltiples funciones neurofisiológicas del organismo.

Kamijima y Casida (2000) apuntaron la posible existencia de otros mecanismos de acción neurotóxicos del fipronil en mamíferos, además de su actividad sobre receptores GABAérgicos ionotrópicos, ya que el fipronil no demostraba una inhibición regional selectiva de la unión del ligando GABAérgico [<sup>3</sup>H]EBOB. El efecto del fipronil sobre otros sistemas de neurotransmisores no ha sido estudiado en mamíferos y los síndromes convulsivos originados por la acción tóxica del fipronil no necesariamente requieren una inhibición de la función GABAérgica.

A la vista de los hechos descritos anteriormente, el objetivo del presente trabajo es evaluar los potenciales efectos neuroquímicos del fipronil sobre los principales neurotransmisores (aminoácidos) en distintas regiones cerebrales, en ratas macho adultas expuestas oralmente a dosis múltiples. A nuestro conocimiento, esta investigación no se ha descrito en la literatura científica.

La elección de la rata como modelo experimental se justifica porque los roedores poseen una serie de ventajas para los estudios toxicológicos, como son su pequeño tamaño, fácil manejo, resistencia a infecciones, corto ciclo de vida y de gestación. Además, proporcionan datos que pueden ser incorporados a la evaluación del riesgo y seguridad de uso, pues se trata de un modelo animal aceptado para proporcionar datos en la evaluación del riesgo de plaguicidas para el hombre (guías de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos-OECD guidelines for testing Chemicals). En los estudios de niveles de neurotransmisores en el SNC, la rata tiene la ventaja añadida de que por el tamaño de su encéfalo permite una buena localización de las distintas regiones encefálicas.

# ***MATERIAL Y MÉTODOS***



## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. PROTOCOLO Y DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se emplearon 20 machos de ratas Wistar, clínicamente sanos, de 7 semanas de edad. Fueron suministrados por Harlan Laboratories Models. Los animales se alojaron en la zona de experimentación del Animalario de la Universidad Complutense de Madrid, que se encuentra registrado en la Dirección General de Agricultura y Alimentación de la Consejería de Economía y Empleo de la Comunidad Autónoma de Madrid, con número de registro 28079-15 ABC-M. Previamente al inicio del experimento, los animales fueron aclimatados tanto a las condiciones ambientales de estudio como a los cuidadores durante una semana. Se alojaron en jaulas individuales de policarbonato, con un lecho de serrín, previamente identificadas, en la zona experimental del Animalario. El alojamiento se mantuvo a una temperatura constante de 22-24°C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h (de 8.00 a 20.00 h) y con una humedad relativa del 50%  $\pm$  10%. La ventilación se mantiene por extracción forzada. Todos los experimentos fueron autorizados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid. Se anotó el peso corporal medio de los animales al principio del experimento (200  $\pm$  10 gramos). El agua y alimento (pienso compuesto Harlan Teklad Global Diet) se suministraron *ad libitum*.

Todas las instalaciones del centro cumplen con las normas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación establecidas en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero de 2013, según Directiva Europea de 22 de septiembre de 2010 (2010/63/UE), por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, garantizando un adecuado nivel de bienestar. El equipo disponible garantiza la observancia de los requisitos dispuestos en la normativa en lo relativo al manejo, el sacrificio y la recogida de muestras de los animales.

Los animales se distribuyeron en los grupos experimentales que a continuación se detallan, cada uno de ellos formado por 5 ratas. El tratamiento administrado a cada grupo varió, de modo que:

1. Grupo control: Estos animales recibieron 0,5 mL/día de aceite de maíz por vía oral, a través de sondaje intragástrico utilizando una jeringa acoplada a una cánula metálica, durante 5 días.
2. Grupo I: Animales tratados con 5 mg/kg p.c./día de fipronil durante 5 días. Para ello, previamente se diluye el fipronil en aceite de maíz a una concentración de 2 mg/mL administrando el volumen correspondiente a cada rata para la dosis de 5 mg/kg p.c., es decir, 0,5 mL por cada 200 g de peso corporal. El tratamiento se administró por sondaje intragástrico utilizando una jeringa acoplada a una cánula metálica.
3. Grupo II: Animales tratados con 10 mg/kg p.c./día de fipronil durante 5 días. Para ello, previamente se diluye el fipronil en aceite de maíz a una concentración de 4 mg/mL administrando el volumen correspondiente a cada rata para la dosis de 10 mg/kg p.c., es decir, 0,5 mL por cada 200 g de peso corporal. El tratamiento se administró por sondaje intragástrico utilizando una jeringa acoplada a una cánula metálica.
4. Grupo III: Animales tratados con 15 mg/kg p.c./día de fipronil durante 5 días. Para ello, previamente se diluye el fipronil en aceite de maíz a una concentración de 6 mg/mL administrando el volumen correspondiente a cada rata para la dosis de 15 mg/kg p.c., es decir, 0,5 mL por cada 200 g de peso corporal. El tratamiento se administró por sondaje intragástrico utilizando una jeringa acoplada a una cánula metálica.

Las dosis elegidas para cada grupo experimental se corresponden aproximadamente con 1/20, 1/10 y 1/6 de la  $DL_{50}$  y fueron decididas tras investigaciones preliminares en nuestro laboratorio. Las dosis de 10 y 15 mg/kg producían principalmente tremor corporal, signo clínico de intoxicación descrito para el fipronil, observándose la posterior reversibilidad de este signo de

intoxicación. El valor de la  $DL_{50}$  oral calculada para el fipronil en aceite de maíz fue de 100 mg/kg p.c.

El tratamiento de los tres grupos experimentales se realizó a las 10,00 h durante 5 días consecutivos. El alimento fue retirado 6 horas antes de suministrar el tratamiento, volviéndose a colocar *ad libitum* una hora después del mismo.

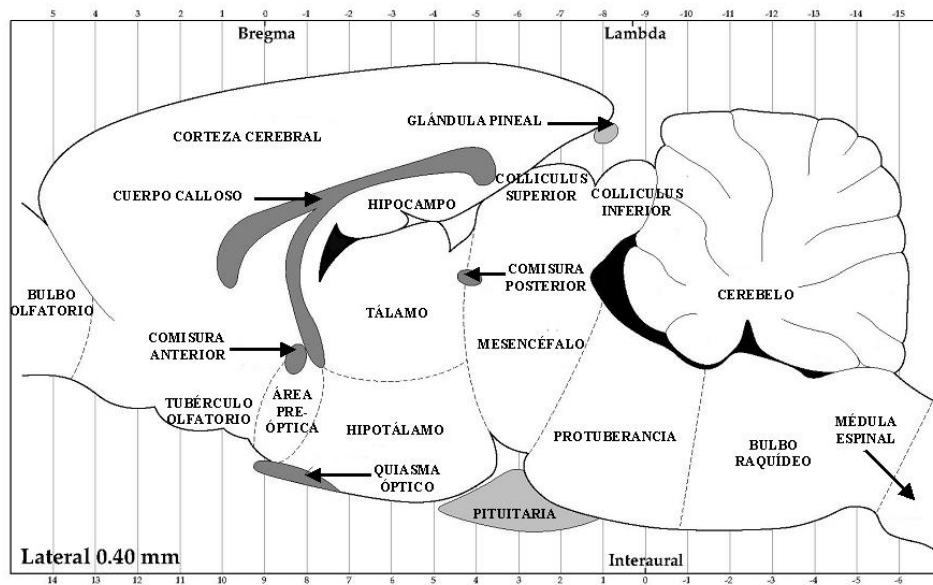
A lo largo del experimento se determinaron el consumo diario de alimento y la variación diaria del peso de cada animal, monitorizando su comportamiento y su estado general.

Las 20 ratas (5 ratas por grupo experimental) se sacrificaron por decapitación, 3 horas después de recibir la última dosis de tratamiento. Rápidamente, se aislaron en frío las siguientes regiones cerebrales siguiendo, con algunas modificaciones introducidas por nuestro laboratorio, el método Glowinski e Iversen (1966):

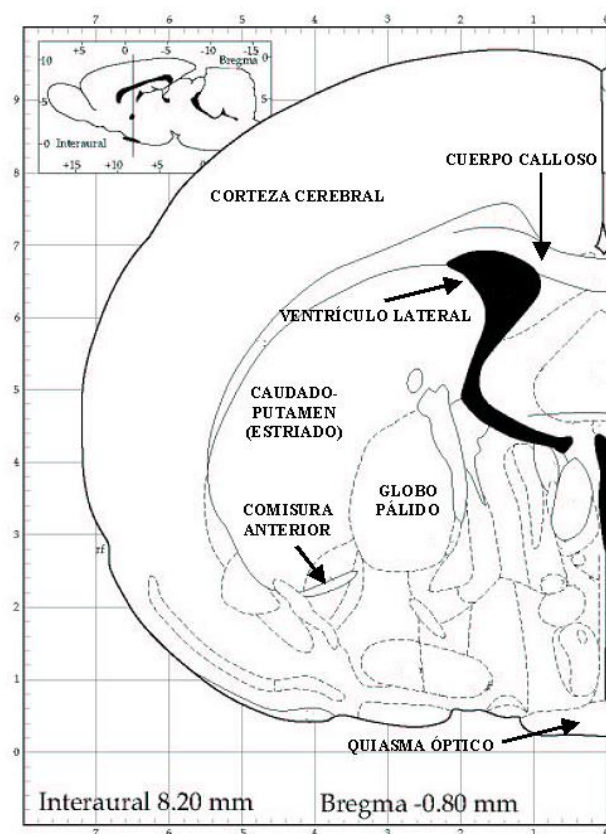
- Hipófisis.
- Hipotálamo.
- Cerebelo
- Bulbo raquídeo.
- Corteza frontal.
- Hipocampo.
- Cuerpo estriado.
- Mesencéfalo.

En primer lugar se separó por un corte transversal el rombencéfalo, obteniendo mediante disección la médula espinal, con cuidado de no cortar el bulbo raquídeo y el cerebelo, que se

separan a continuación (Figura 16 y Figura 17). Seguidamente se diseccionó el hipotálamo, mediante un corte transversal a nivel del quiasma óptico hasta la comisura anterior, que se tomó como referencia horizontal. Se continuó tomando una muestra de la corteza frontal y se procedió a la separación del cuerpo estriado, mesencéfalo e hipocampo. Para la disección del cuerpo estriado se tomaron las paredes externas de los ventrículos laterales como límite interno y el cuerpo calloso como límite externo. Finalmente, se separaron el mesencéfalo y el hipocampo.



**Figura 16.** Representación de las distintas partes del encéfalo de la rata Wistar en un corte en el plano sagital (0,40 mm con respecto a la medial). Modificada de Paraxinos y Watson (1998).



**Figura 17.** Representación de un corte en el plano coronal del encéfalo de la rata Wistar (Bregma – 0,80 mm) en el que se aprecia el estriado (no visible en la figura anterior). Modificada de Paraxinos y Watson (1998).

Los tejidos se mantuvieron en frío durante toda su manipulación. Una vez extraídas las regiones cerebrales, se pesaron, guardándose separadamente en tubos Eppendorf debidamente identificados y se sumergieron en ácido acético 2N, según los volúmenes descritos a continuación en la Tabla 11:

Regiones cerebrales	Ratas Control (µl)	Ratas Tratadas (µl)
Hipófisis	200	300
Hipotálamo	500	400
Hipocampo	500	400
Cuerpo Estriado	200	400
Mesencéfalo	500	800
Corteza Cerebral	500	400
Cerebelo	500	800
Bulbo Raquídeo	500	800

**Tabla 11.** Volúmenes de ácido acético 2N adicionados a las distintas regiones cerebrales y grupos de ratas.



El ácido acético se empleó ya que provoca la desnaturalización de las enzimas responsables de la catabolización y degradación de los aminoácidos que fueron objeto de estudio en esta Tesis.

Seguidamente, las muestras se homogeneizaron en frío (tubos dentro de un recipiente con hielo picado), mediante una sonda de ultrasonidos, para romper los tejidos y las células, liberando así los aminoácidos. A continuación, se centrifugaron a 11000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.

El sobrenadante se calentó a 100°C durante 7 minutos, luego se enfrió en hielo, y posteriormente se sometió a una segunda centrifugación a 13000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, el sobrenadante obtenido se congeló a -80°C, hasta la determinación de los aminoácidos.

### **2.2. MÉTODO ANALÍTICO: DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS NEUROTRANSMISORES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN Y DETECCIÓN FLUORIMÉTRICA**

Con el objetivo de determinar y cuantificar los aminoácidos glutamato, aspartato, glutamina, taurina y GABA, hemos utilizado la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia, siguiendo el método establecido por Duvilanski *et al.* (1998), modificado por Lafuente *et al.* (2001).

La luminiscencia se define como la intensidad de luz emitida por parte de átomos o moléculas excitados electrónicamente. Para producir la excitación electrónica es necesario aportar energía, y en función del tipo de energía aportada se pueden distinguir varios tipos de luminiscencia (electroluminiscencia, quimioluminiscencia, termoluminiscencia y fotoluminiscencia). En el caso de la fotoluminiscencia, la excitación se lleva a cabo utilizando una fuente de radiación infrarroja, visible o ultravioleta. La radiación emitida tiene una longitud

de onda más larga que la de la radiación absorbida. Se distinguen dos tipos de luminiscencia. Para un pequeño lapso de tiempo,  $\leq 10^{-8}$  segundos, entre excitación y emisión, el proceso es conocido como fluorescencia. La fluorescencia cesa tan pronto como la fuente de excitación es retirada. Para un tiempo de decaimiento mucho más largo, el proceso es conocido como fosforescencia. Este proceso puede continuar un largo lapso de tiempo después de retirar la fuente de excitación.

La detección de los citados aminoácidos se ha llevado a cabo aprovechando la fluorescencia que éstos emiten tras una reacción de derivatización con O-phthaldialdehyde (OPA) en medio alcalino, siguiendo el método establecido por Blundell y Brydon (1987). Para cuantificar la radiación emitida al exponer a las muestras a un haz de radiación eletromagnética procedente de una lámpara de luz ultravioleta, se ha utilizado un detector de fluorescencia (Skoog y Leary, 1994).

### **Reacción de derivatización**

Antes de inyectar la muestra o el patrón en el sistema cromatográfico, se realiza una reacción de derivatización y se añade el patrón interno (homoserina).

Para llevar a cabo la reacción de derivatización de los patrones, se adicionan sucesivamente y en el orden indicado:

- 20  $\mu$ L del patrón.
- 10  $\mu$ L de homoserina (patrón interno).
- 10  $\mu$ L de NaOH 4N.
- 40  $\mu$ L de la disolución de OPA previamente preparada.
- La mezcla se agita durante un minuto para que los aminoácidos reaccionen con la OPA.
- 20  $\mu$ L de ácido acético al 5%.

- Agitar e inyectar inmediatamente el patrón en el cromatógrafo.

En el caso de las muestras, la reacción de derivatización se efectúa de acuerdo con los siguientes pasos:

- 18  $\mu\text{L}$  de fase A + 2  $\mu\text{L}$  de muestra o 19  $\mu\text{L}$  de fase A + 1  $\mu\text{L}$  de muestra (dilución 1:10 o 0.5:10 de las muestras en fase A, respectivamente). Esta dilución se realiza para optimizar el proceso de detección.
- 10  $\mu\text{L}$  de homoserina a una concentración de 84  $\mu\text{g/mL}$  (patrón interno).
- 10  $\mu\text{L}$  de NaOH 4N.
- 40  $\mu\text{L}$  de la disolución de OPA previamente preparada.
- La mezcla se agita durante un minuto para que los aminoácidos reaccionen con la OPA.
- 20  $\mu\text{L}$  de ácido acético al 5%.
- Agitar e inyectar inmediatamente el patrón en el cromatógrafo.

El NaOH 4N se adiciona al medio para alcalinizarlo y facilitar así la reacción posterior de la disolución de OPA con los aminoácidos de la muestra o patrón. De igual forma, el ácido acético al 5% se añade para detener dicha reacción.

### **Procedimiento de trabajo y condiciones cromatográficas**

El sistema cromatográfico utilizado fue un Shimadzu equipado con bomba de gradiente LC-20AT, detector de fluorescencia RF-551, desgasificador DGU-20A3 y autoinyector.

Se emplearon dos fases móviles, a un flujo de 1 mL/minuto y a una presión de 140-160 bares. Las fases móviles utilizadas fueron:

- Fase A: constituida por un tampón de acetato sódico 0,1 M al 70% y metanol al 30%. El pH se ajustó a 6,75 con ácido acético glacial, y posteriormente se desgasificó en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos (Transsonic 460, Elma).
- Fase B: constituida por metanol/agua (70% v/v).

Estas dos fases móviles se emplearon estableciéndose el gradiente descrito en la Tabla 12.

Tiempo	Concentración Fase Móvil (% de fase B)
0-5 min	100% de Fase A 0% de fase B (estabilización del sistema)
5-8 min	Aumento de 0% a 35% de fase B
8-13 min	65% de Fase A 35% de fase B
13-20 min	Aumento de 35% a 100% de fase B
20-40 min	100% de fase B (limpieza del sistema)
40-45 min	Descenso de 100% a 0% de fase B
45-55 min	100% de Fase A 0% de fase B

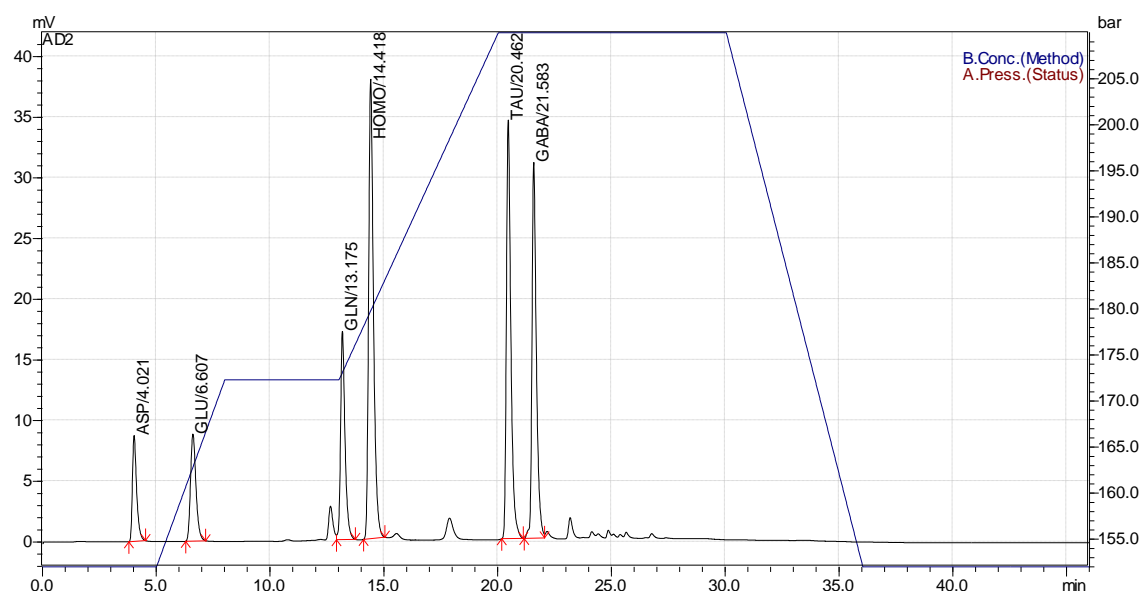
**Tabla 12. Gradiente utilizado para las fases móviles.**

El minuto 0 se corresponde con el momento de inyectar en el sistema cromatográfico los 20 µL de la mezcla obtenida de la reacción de derivatización, ya sea la muestra o estándar de referencia.

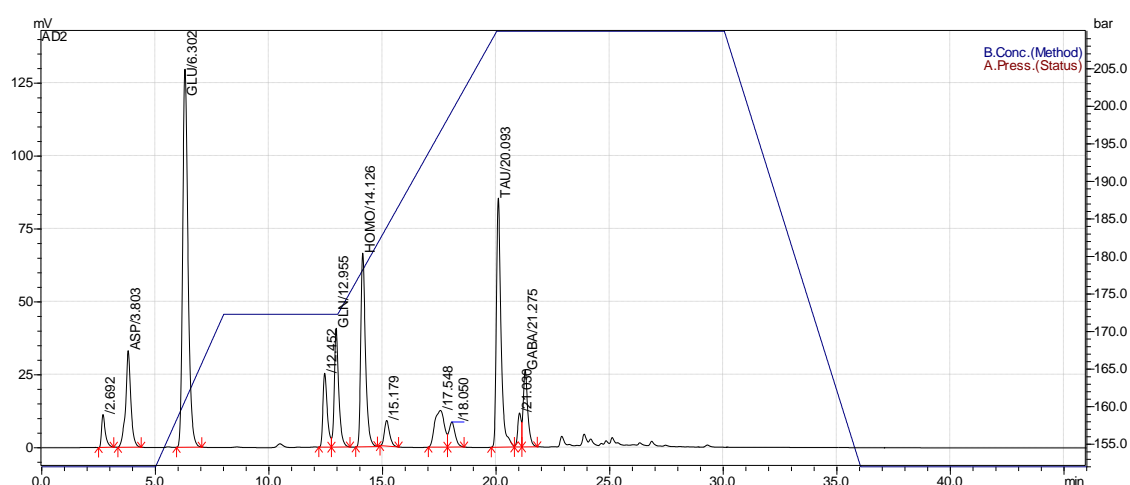
En el detector de fluorescencia se fijó una longitud de onda de excitación de 340 nm y una longitud de onda de emisión de 455 nm.

Las rectas de calibrado para glutamato, aspartato, glutamina, taurina y GABA fueron lineales a las concentraciones de 10,5, 21, 42, 84, 210, 420 µg/ml. Los coeficientes de variación intra-día e inter-día fueron inferiores al 4%. En las muestras tisulares de SNC la recuperación analítica media fue del 100% para los cinco aminoácidos. El método fue selectivo para glutamato,

aspartato, glutamina, taurina y GABA, no observándose en los cromatogramas ninguna interferencia con otros compuestos endógenos propios de las muestras biológicas. A continuación se muestran varios de los cromatogramas obtenidos:



**Figura 18. Cromatograma de una mezcla estándar que contiene, en orden creciente de tiempo de retención, aspartato, glutamato, homoserina (patrón interno), taurina y GABA.**



**Figura 19. Cromatograma correspondiente a una muestra de hipófisis.**

## **2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS**

Para realizar el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos, se ha utilizado el programa informático SPSS V. 24.0 para Windows, aplicando un ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* Dunnett. Los valores de las tablas se expresan como la media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media ( $X \pm E.S.M.$ ). El nivel de confianza a partir del cual las diferencias entre las medias fueron consideradas significativas fue mayor o igual del 95% ( $P < 0,05$ ). Las diferencias entre las medias de los grupos se establecieron en tres niveles de significación:  $*P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$ ,  $***P < 0,001$ .

## **2.4. REACTIVOS**

- Ácido Acético (Merck).
- Hidróxido sódico (Merck).
- Fipronil (pureza > 99%) (donado por la empresa farmacéutica Merial).
- 2-mercaptoetanol (Sigma).
- Aspartato (Sigma).
- Ácido bórico (Panreac).
- Ácido gamma aminobutírico (GABA) (Sigma).
- Acetato de sodio anhidro (Merck).
- Glutamato (Sigma).
- Glutamina (Sigma).
- Hidróxido potásico (Sigma).
- Homoserina, utilizada como patrón interno (Sigma).
- Metanol (Lab-Scan).
- O-Phthaldialdehyde (OPA) (Sigma).
- Taurina (Sigma).

**Preparación de la disolución de OPA:** La disolución de OPA 4 mM y pH 9,5, con borato potásico (1,6 M), metanol (10%) y 2-mercaptoetanol (2,56 mM) se prepara tal y como se indica a continuación:

- Se prepara una disolución de borato potásico 1,6 M y pH 9,5, adicionando 9,9 g de ácido bórico y 5,2 g de hidróxido potásico. Todo ello, se lleva a 100 mL con agua miliQ.
- Seguidamente, se toman 7,14 mL de esta disolución y se añaden 32 mg de OPA, 800  $\mu$ L de metanol y 55  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol.

### ***2.5. APARATOS Y MATERIALES UTILIZADOS***

- Congelador de -80°C; Angelantoni Industrie, modelo Platinum 370H.
- Balanza electrónica de precisión digital; AND ER-182<sup>a</sup>.
- Centrífuga refrigerada; Sorvall Instruments Dupont, modelo RC5C.
- Sonda de ultrasonidos para disgregación celular; Labsonic U-Braun.
- Accublock Digital Dry Bath; Labnet International.
- Material de vidrio y plástico de uso general en laboratorio.

El equipo cromatográfico utilizado consta de:

- Bomba de gradiente (Shimadzu LC-20AT). Impulsa las fases móviles y la muestra a través del circuito.
- Autoinyector, para muestras de tejidos y patrones de aminoácidos, con cargador de 20  $\mu$ L.
- Columna separadora ACE 5 C18, con diámetro de poro de 5  $\mu$ m, diámetro interno de 4,6 mm y longitud de 150 mm (ACE HPLC Columns, suministrada por Symta, S.A.U.).
- Detector de fluorescencia (Shimadzu RF-551).
- Desgasificador (Shimadzu DGU-20A3).

Programa informático Shimadzu LC Solution, para el estudio de los cromatogramas y la integración de los picos de los aminoácidos estudiados.

## ***RESULTADOS***





### 3. RESULTADOS

La administración oral de fipronil en ratas a dosis de 5 mg/kg p.c., 10 mg/kg p.c. y 15 mg/kg p.c. durante 5 días consecutivos, no produjo mortalidad en ninguno de los animales. Sin embargo, las dosis de 10 y 15 mg fipronil/kg p.c./día, indujeron la aparición de signos clínicos de intoxicación que se caracterizaron por tremor corporal entre las 1 y 2 horas después del tratamiento. Estos signos fueron reversibles a las 3 horas después del tratamiento.

En lo que respecta a los efectos del fipronil sobre el peso corporal al final de los 5 días de tratamiento, se observó una disminución estadísticamente significativa en los animales tratados con 10 mg/kg p.c./día (Tabla 13;  $P < 0,05$ ; reducción del 68%) y con 15 mg/kg p.c./día (Tabla 13;  $P < 0,01$ ; reducción del 96%). Del mismo modo, a dosis de 10 y 15 mg/kg p.c./día durante 5 días, se produjo una reducción estadísticamente significativa del alimento ingerido (Tabla 13;  $P < 0,001$ ; descenso del 26% y 35%, respectivamente).

Grupo	Incremento de peso (g)	Total alimento ingerido (g)
Grupo I Control	22.6 $\pm$ 3.2	97.6 $\pm$ 2.8
Grupo II 5 mg/kg p.c.	12 $\pm$ 4	101.2 $\pm$ 8.2
Grupo III 10 mg/kg p.c.	7.2 $\pm$ 3.3 * (-68%)	72.4 $\pm$ 4.1 *** (-26%)
Grupo IV 15 mg/kg p.c.	1 $\pm$ 3.3 ** (-96%)	63.4 $\pm$ 6.7 ** (-35%)

**Tabla 13. Efecto del fipronil sobre el incremento de peso corporal y el consumo de alimento, durante el análisis de las variaciones de la concentración de aminoácidos neurotransmisores en el cerebro de la rata.** Valor medio ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control:

\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  y \*\*\* $P < 0,001$ .

### 3.1. VARIACIONES DE LA CONCENTRACIÓN DE AMINOÁCIDOS A NIVEL CEREBRAL EN RATA MACHO ADULTA EXPUESTA AL FIPRONIL

El tratamiento oral de fipronil afectó de forma dosis-dependiente al contenido de los aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA en las regiones del SNC estudiadas.

#### Variaciones de la concentración de aminoácidos a nivel de la hipófisis en rata macho adulta expuesta oralmente al fipronil

	HIPÓFISIS (ng/ g tejido)				
	Aspartato	Glutamato	Glutamina	Taurina	GABA
<b>Grupo I</b> <b>Control</b>	4883,84 ± 417,70	8213,13 ± 468,86	2067,26 ± 205,61	6348,31 ± 797,55	1793,64 ± 124,63
<b>Grupo II</b> <b>5 mg/kg p.c.</b>	5383,02 ± 43,77	8755,02 ± 381,38	2391,72 ± 176,23	6587,91 ± 277,37	2126,88 ± 109,23
<b>Grupo III</b> <b>10 mg/kg p.c.</b>	5307,19 ± 217,79	8626,85 ± 406,87	3235,27 ± 78,99 *** (56,50%)	6095,99 ± 364,98	2030,67 ± 125,65
<b>Grupo IV</b> <b>15 mg/kg p.c.</b>	2402,26 ± 189,48 *** (-50,81%)	3807,16 ± 303,61 *** (-53,65%)	3428,58 ± 161,10 *** (65,85%)	2182,90 ± 192,24 *** (-65,61%)	1043,64 ± 62,02 *** (-41,81%)

**Tabla 14. Efecto del fipronil, dosis dependiente, sobre el contenido de aminoácidos neurotransmisores (ng/ g tejido) en la hipófisis de rata.** Valor medio ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \*\*\*P<0,001.

En la hipófisis, el tratamiento oral de fipronil a dosis de 15 mg/kg p.c./día durante 5 días, indujo una disminución significativa en la concentración de aspartato ( Tabla 14; P < 0,001; descenso del 50,81%), glutamato ( Tabla 14; P < 0,001; descenso del 53,65%), taurina ( Tabla 14; P < 0,001; descenso del 65,61%) y GABA ( Tabla 14; P < 0,001; descenso del 41,81%). Sin embargo, las dosis de 5 y 10 mg/kg p.c. de fipronil durante 5 días, no produjeron variaciones estadísticamente significativas en las concentraciones de estos neurotransmisores a nivel de la hipófisis.

## RESULTADOS

Las dosis de 10 y 15 mg/kg p.c./día de fipronil durante 5 días provocaron un aumento estadísticamente significativo de la concentración de glutamina (Tabla 14;  $P < 0,001$ ; aumento del 56,50% y 65,85%, respectivamente) en la hipófisis.

### Variaciones de la concentración de aminoácidos a nivel del hipotálamo en rata macho adulta expuesta oralmente al fipronil

	HIPOTÁLAMO (ng/ g tejido)				
	Aspartato	Glutamato	Glutamina	Taurina	GABA
<b>Grupo I</b> <b>Control</b>	5007,88 ± 259,26	11053,32 ± 668,71	1596,02 ± 165,82	2166,21 ± 141,65	4109,92 ± 236,81
<b>Grupo II</b> <b>5 mg/kg p.c.</b>	4453,46 ± 207,21	10161,20 ± 572,74	1203,60 ± 68,83 *** (-24,59%)	1798,91 ± 86,06 *** (-16,96%)	4024,83 ± 182,07
<b>Grupo III</b> <b>10 mg/kg p.c.</b>	4248,73 ± 243,37 *** (-15,16%)	10041,48 ± 114,01	1287,82 ± 50,81 *** (-19,31%)	1623,03 ± 49,13 *** (-25,08%)	3696,02 ± 269,81
<b>Grupo IV</b> <b>15 mg/kg p.c.</b>	1939,99 ± 216,18 *** (-61,26%)	3845,20 ± 247,86 *** (-65,21%)	681,13 ± 18,24 *** (-57,32%)	729,16 ± 32,78 *** (-66,34%)	1896,75 ± 67,26 *** (-53,85%)

**Tabla 15. Efecto del fipronil, dosis dependiente, sobre el contenido de aminoácidos neurotransmisores (ng/ g tejido) en el hipotálamo de rata.** Valor medio ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \*\*\* $P < 0,001$ .

El tratamiento oral de fipronil a dosis de 5 mg/kg p.c. durante 5 días, originó un descenso estadísticamente significativo en los niveles de glutamina (Tabla 15;  $P < 0,001$ ; descenso del 24,59%) y taurina (Tabla 15;  $P < 0,001$ ; descenso del 16,96%).

Asimismo, la dosis de 10 mg/kg p.c de fipronil, durante 5 días, originó una reducción significativa de los niveles de aspartato (Tabla 15;  $P < 0,001$ ; descenso del 15,16%), glutamina (Tabla 15;  $P < 0,001$ ; descenso del 19,31%) y taurina (Tabla 15;  $P < 0,001$ ; descenso del 25,08%).

Finalmente, en los animales que recibieron la dosis de 15 mg/kg p.c de fipronil durante 5 días, se produjo un descenso estadísticamente significativo de la concentración de todos los aminoácidos estudiados, de aspartato (Tabla 15;  $P < 0,001$ ; descenso del 61,26%), glutamato

## RESULTADOS

(Tabla 15;  $P < 0,001$ ; descenso del 65,21%), glutamina (Tabla 15;  $P < 0,001$ ; descenso del 57,32%), taurina (Tabla 15;  $P < 0,001$ ; descenso del 66,34%) y GABA (Tabla 15;  $P < 0,001$ ; descenso del 53,85%).

### Variaciones de la concentración de aminoácidos a nivel del cerebelo en rata macho adulta expuesta oralmente al fipronil

	CEREBELO (ng/ g tejido)				
	Aspartato	Glutamato	Glutamina	Taurina	GABA
<b>Grupo I</b> <b>Control</b>	5603,66 ± 95,65	20243,56 ± 234,34	1727,59 ± 55,56	5355,32 ± 145,89	2364,77 ± 108,33
<b>Grupo II</b> <b>5 mg/kg p.c.</b>	7358,82 ± 555,49 *** (31,32%)	24490,28 ± 2463,15	2671,43 ± 309,86 *** (54,63%)	6620,62 ± 778,96	4907,97 ± 502,04 *** (107,54%)
<b>Grupo III</b> <b>10 mg/kg p.c.</b>	7214,52 ± 415,71 *** (28,75%)	30550,12 ± 629,07 *** (49,73%)	2939,25 ± 127,25 *** (70,14%)	6871,84 ± 107,50 *** (28,32%)	3929,70 ± 17,28 *** (66,18%)
<b>Grupo IV</b> <b>15 mg/kg p.c.</b>	14835,95 ± 617,76 *** (164,75%)	45916,44 ± 3387,57 *** (125,04%)	5327,56 ± 167,82 *** (208,38%)	13147,11 ± 474,11 *** (145,50%)	7522,01 ± 376,23 *** (218,09%)

**Tabla 16. Efecto del fipronil, dosis dependiente, sobre el contenido de aminoácidos neurotransmisores (ng/ g tejido) en el cerebelo de rata.** Valor medio ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \*\*\* $P < 0,001$ .

En el cerebelo, se observó un aumento estadísticamente significativo en los niveles de aspartato, glutamina y GABA con respecto al grupo control, tanto en los animales tratados oralmente con dosis de 5 mg/kg p.c. de fipronil durante 5 días (Tabla 16;  $P < 0,001$ ; aumento del 31,32%, 54,63% y 107,54%, respectivamente), como en los animales tratados con dosis de 10 mg/kg p.c. de fipronil durante 5 días (Tabla 16;  $P < 0,001$ ; aumento del 28,75%, 70,14% y 66,18%, respectivamente) y con dosis de 15 mg/kg p.c. de fipronil durante 5 días (Tabla 16;  $P < 0,001$ ; aumento del 164,75%, 208,38% y 218,09%, respectivamente).

De igual forma, se produjo, de forma dosis-dependiente, un incremento estadísticamente significativo en las ratas tratadas oralmente con dosis de 10 y 15 mg/kg p.c. de fipronil durante 5 días con respecto a la concentración de glutamato (Tabla 16;  $P < 0,001$ ; aumento del 49,73% y

125,04%, respectivamente) y taurina (Tabla 16;  $P < 0,001$ ; aumento del 28,32% y 145,50%, respectivamente).

### Variaciones de la concentración de aminoácidos a nivel del bulbo raquídeo en rata macho adulta expuesta oralmente al fipronil

	BULBO RAQUÍDEO (ng/ g tejido)				
	Aspartato	Glutamato	Glutamina	Taurina	GABA
<b>Grupo I</b> <b>Control</b>	5905,96 ± 29,54	10853,29 ± 326,75	1129,87 ± 36,05	1459,67 ± 81,42	1876,88 ± 105,58
<b>Grupo II</b> <b>5 mg/kg p.c.</b>	7572,60 ± 415,47	13220,90 ± 610,13	2004,87 ± 157,73 ** (77,44%)	2021,08 ± 130,36	3304,28 ± 253,50 ** (76,05%)
<b>Grupo III</b> <b>10 mg/kg p.c.</b>	6256,06 ± 535,67	12160,02 ± 919,83	1523,13 ± 72,85	1678,13 ± 179,25	2145,73 ± 208,88
<b>Grupo IV</b> <b>15 mg/kg p.c.</b>	6867,87 ± 553,25	12430,50 ± 998,35	1723,72 ± 196,46 ** (52,56%)	1771,82 ± 170,19	2444,57 ± 231,45

**Tabla 17. Efecto del fipronil sobre el contenido de aminoácidos neurotransmisores (ng/ g tejido) en el bulbo raquídeo de rata.** Valor medio ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \*\* $P < 0,01$ .

Tras la exposición oral a 5 mg/kg p.c. de fipronil durante 5 días, se produjo un aumento estadísticamente significativo en los niveles de glutamina (Tabla 17;  $P < 0,01$ ; incremento del 77,44%) y de los niveles de GABA (Tabla 17;  $P < 0,01$ ; incremento del 76,05%). El resto de aminoácidos neurotransmisores estudiados no sufrieron variaciones estadísticamente significativas. El fipronil, a dosis de 15 mg/kg p.c. durante 5 días, dio lugar también a un incremento estadísticamente significativo de los niveles de glutamina, pero no fue dosis dependiente (Tabla 17;  $P < 0,01$ ; incremento del 52,56%).

## Variaciones de la concentración de aminoácidos a nivel de la corteza cerebral en rata macho adulta expuesta oralmente al fipronil

	CORTEZA CEREBRAL (ng/ g tejido)				
	Aspartato	Glutamato	Glutamina	Taurina	GABA
<b>Grupo I</b> <b>Control</b>	8005,89 ± 282,34	22042,86 ± 820,05	2292,68 ± 80,89	5881,33 ± 232,53	2566,74 ± 153,54
<b>Grupo II</b> <b>5 mg/kg p.c.</b>	6878,94 ± 593,89	20559,15 ± 1777,26	2415,72 ± 224,97	5494,72 ± 444,11	2567,53 ± 204,29
<b>Grupo III</b> <b>10 mg/kg p.c.</b>	7011,04 ± 565,64	20700,47 ± 1599,30	2461,58 ± 228,14	5391,61 ± 382,37	2642,48 ± 232,39
<b>Grupo IV</b> <b>15 mg/kg p.c.</b>	7272,02 ± 870,00	19585,11 ± 1313,79	2723,80 ± 151,96	7546,35 ± 754,74 * (28,31%)	4944,08 ± 261,64 *** (92,62%)

**Tabla 18. Efecto del fipronil sobre el contenido de aminoácidos neurotransmisores (ng/ g tejido) en la corteza cerebral de rata.** Valor medio ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \*P<0,05 y \*\*\*P<0,001.

La administración oral de 15 mg/kg p.c. de fipronil durante 5 días, produjo un aumento estadísticamente significativo de los niveles de taurina (Tabla 18; P < 0,05; incremento del 28,31%) y GABA (Tabla 18; P < 0,001; incremento del 92,62%) en la corteza cerebral.

Los niveles de aminoácidos neurotransmisores estudiados no sufrieron variaciones estadísticamente significativas tras el tratamiento oral de fipronil.

## Variaciones de la concentración de aminoácidos a nivel del hipocampo en rata macho adulta expuesta oralmente al fipronil

	HIPOCAMPO (ng/ g tejido)				
	Aspartato	Glutamato	Glutamina	Taurina	GABA
<b>Grupo I</b> <b>Control</b>	3934,50 ± 58,51	14108,63 ± 533,79	1802,96 ± 90,24	4613,90 ± 212,39	2289,36 ± 145,91
<b>Grupo II</b> <b>5 mg/kg p.c.</b>	4342,50 ± 161,49	15094,68 ± 564,84	1802,75 ± 47,75	4658,30 ± 342,24	2581,71 ± 74,67
<b>Grupo III</b> <b>10 mg/kg p.c.</b>	3395,41 ± 283,08 *** (-13,70%)	12379,75 ± 368,19 *** (-12,25%)	1487,76 ± 35,25 *** (-17,48%)	4202,05 ± 195,11	2401,07 ± 99,73
<b>Grupo IV</b> <b>15 mg/kg p.c.</b>	1174,58 ± 71,71 *** (-70,15%)	3961,56 ± 136,65 *** (-71,92%)	521,76 ± 17,53 *** (-71,06%)	1281,88 ± 45,81 *** (-72,22%)	916,31 ± 70,12 *** (-59,98%)

**Tabla 19. Efecto del fipronil, dosis dependiente, sobre el contenido de aminoácidos neurotransmisores (ng/ g tejido) en el hipocampo de rata.** Valor medio ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \*\*\*P<0,001.

Se produjo un descenso significativo de la concentración de aspartato (Tabla 19; P < 0,001; reducción del 13,70%), glutamato (Tabla 19; P < 0,001; reducción del 12,25%) y glutamina (Tabla 19; P < 0,001; reducción del 17,48%) en el hipocampo tras la administración oral de 10 mg/kg p.c. de fipronil durante 5 días.

De igual forma, dosis-dependiente, este mismo descenso significativo se observa en los niveles de todos los aminoácidos estudiados a dosis de 15 mg/kg p.c. de fipronil durante 5 días (aspartato: Tabla 19; P < 0,001; reducción del 70,15%; glutamato: Tabla 19; P < 0,001; reducción del 71,92%; glutamina: Tabla 19; P < 0,001; reducción del 71,06%; taurina: Tabla 19; P < 0,001; reducción del 72,22%; GABA: Tabla 19; P < 0,001; reducción del 59,98%).



## Variaciones de la concentración de aminoácidos a nivel del cuerpo estriado en rata macho adulta expuesta oralmente al fipronil

	CUERPO ESTRIADO (ng/ g tejido)				
	Aspartato	Glutamato	Glutamina	Taurina	GABA
<b>Grupo I</b> <b>Control</b>	4494,04 ± 346,62	18559,17 ± 1301,45	2387,69 ± 242,35	8057,17 ± 559,68	2695,76 ± 187,22
<b>Grupo II</b> <b>5 mg/kg p.c.</b>	5981,55 ± 384,03 * (33,10%)	21453,39 ± 1250,74	3561,17 ± 96,42 ** (49,15%)	8707,95 ± 691,58	5505,46 ± 128,95 *** (104,23%)
<b>Grupo III</b> <b>10 mg/kg p.c.</b>	6046,22 ± 571,14 * (34,54%)	23720,71 ± 1027,88 * (27,81%)	3497,81 ± 226,15 ** (46,49%)	10189,93 ± 615,35	4324,05 ± 267,44 *** (60,40%)
<b>Grupo IV</b> <b>15 mg/kg p.c.</b>	6061,79 ± 252,23 * (34,89%)	22111,64 ± 864,76 * (19,14%)	3110,73 ± 195,28 ** (30,28%)	8928,64 ± 357,10	3640,83 ± 183,72 *** (35,06%)

**Tabla 20. Efecto del fipronil sobre el contenido de aminoácidos neurotransmisores (ng/ g tejido) en el cuerpo estriado de rata.** Valor medio ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \*P<0,05, \*\*P<0,01 y \*\*\*P<0,001.

Los animales que recibieron la dosis de 5 mg/kg p.c. de fipronil durante 5 días, sufrieron un aumento estadísticamente significativo de la concentración de aspartato a nivel de cuerpo estriado (Tabla 20; P < 0,05; incremento del 33,10%), glutamina (Tabla 20; P < 0,01; incremento del 49,15%) y GABA (Tabla 20; P < 0,001; incremento del 104,23%).

Similarmente, la concentración de aspartato en cuerpo estriado (Tabla 20; P < 0,05; incremento del 34,54%), glutamato (Tabla 20; P < 0,05; incremento del 27,81%), glutamina (Tabla 20; P < 0,01; incremento del 46,49%) y GABA (Tabla 20; P < 0,001; incremento del 60,40%) aumenta de forma estadísticamente significativa tras la exposición oral a 10 mg/kg p.c. de fipronil durante 5 días.

La dosis de 15 mg/kg p.c. de fipronil durante 5 días, también dio lugar a un incremento estadísticamente significativo de los niveles de aspartato (Tabla 20; P < 0,05; aumento del 34,89%), glutamato (Tabla 20; P < 0,05; aumento del 19,14%), glutamina (Tabla 20; P < 0,01; aumento del 30,28%) y GABA (Tabla 20; P < 0,001; aumento del 35,06%).

Sin embargo, la taurina no sufrió en cuerpo estriado variaciones estadísticamente significativas tras el tratamiento oral de fipronil a las dosis objeto de estudio.

### Variaciones de la concentración de aminoácidos a nivel del mesencéfalo en rata macho adulta expuesta oralmente al fipronil

	MESENCÉFALO (ng/ g tejido)				
	Aspartato	Glutamato	Glutamina	Taurina	GABA
<b>Grupo I</b> <b>Control</b>	5604,53 ± 21,40	12332,66 ± 229,61	1108,63 ± 9,25	2038,84 ± 17,17	2910,91 ± 199,09
<b>Grupo II</b> <b>5 mg/kg p.c.</b>	5889,59 ± 257,55	13461,35 ± 76,48	1630,35 ± 15,37 ** (47,06%)	1824,17 ± 54,61	3670,04 ± 81,46 *** (26,08%)
<b>Grupo III</b> <b>10 mg/kg p.c.</b>	6734 ± 500,17 ** (20,15%)	15705,61 ± 302,50 * (27,35%)	1873,86 ± 222,28 ** (69,02%)	2393,60 ± 19,50 *** (17,40%)	4461,34 ± 277,48 *** (53,26%)
<b>Grupo IV</b> <b>15 mg/kg p.c.</b>	7229,71 ± 296,82 ** (29,00%)	16222,49 ± 1363,68 * (31,54%)	2072,21 ± 49,82 ** (86,92%)	3135,52 ± 68,35 *** (53,79%)	6104,78 ± 223,91 *** (109,72%)

**Tabla 21. Efecto del fipronil, dosis dependiente, sobre el contenido de aminoácidos neurotransmisores (ng/ g tejido) en el mesencéfalo de rata.** Valor medio ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \*P<0,05, \*\*P<0,01 y \*\*\*P<0,001.

En el mesencéfalo, el tratamiento oral con dosis de 5 mg/kg p.c. de fipronil durante 5 días, indujo un aumento estadísticamente significativo en las concentraciones de glutamina (Tabla 21; P < 0,01; aumento del 47,06%) y GABA (Tabla 21; P < 0,001; aumento del 26,08%).

En los animales expuestos oralmente a 10 y 15 mg/kg p.c. de fipronil durante 5 días, se observa, de forma dosis dependiente, un aumento estadísticamente significativo de la concentración de aspartato (Tabla 21; P < 0,01; aumento del 20,15% y 29,00%, respectivamente), glutamato (Tabla 21; P < 0,05; aumento del 27,35% y 31,54%, respectivamente), glutamina (Tabla 21; P < 0,01; aumento del 69,02% y 86,92%, respectivamente), taurina (Tabla 21; P < 0,001; aumento del 17,40% y 53,79%, respectivamente) y GABA (Tabla 21; P < 0,001; aumento del 53,26% y 109,72%, respectivamente).

La Tabla 22 recoge, de forma global, el efecto del fipronil sobre los niveles de los aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA en todas las regiones cerebrales estudiadas.

A partir de este estudio de neurotoxicidad, tras la exposición oral de fipronil, a efectos de evaluación del riesgo toxicológico, se puede identificar un LOAEL de 5 mg/kg p.c./día, siendo los puntos críticos toxicológicos una disminución del consumo de alimento, una disminución de los niveles de los aminoácidos glutamina y taurina en hipotálamo, un aumento de los niveles de glutamina y GABA en cerebelo, cuerpo estriado y en mesencéfalo.

## RESULTADOS

Concentración tisular (ng/g)	Corteza frontal	Hipocampo	Cuerpo estriado	Cerebelo	Hipotálamo	Hipófisis	Bulbo raquídeo	Mesencéfalo
<b>Grupo Control</b>								
<b>Aspartato</b>	8005,89 ± 282,34	3934,50 ± 58,51	4494,04 ± 346,62	5603,66 ± 95,65	5007,88 ± 259,26	4883,84 ± 417,70	5905,96 ± 29,54	5604,53 ± 21,40
<b>Glutamato</b>	22042,86 ± 820,05	14108,63 ± 533,79	18559,17 ± 1301,45	20243,56 ± 234,34	11053,32 ± 668,71	8213,13 ± 468,86	10853,29 ± 326,75	12332,66 ± 229,61
<b>Glutamina</b>	2292,68 ± 80,89	1802,96 ± 90,24	2387,69 ± 242,35	1727,59 ± 55,56	1596,02 ± 165,82	2067,26 ± 205,61	1129,87 ± 36,05	1108,63 ± 9,25
<b>Taurina</b>	5881,33 ± 232,53	4613,90 ± 212,39	8057,17 ± 559,68	5355,32 ± 145,89	2166,21 ± 141,65	6348,31 ± 797,55	1459,67 ± 81,42	2038,84 ± 17,17
<b>GABA</b>	2566,74 ± 153,54	2289,36 ± 145,91	2695,76 ± 187,22	2364,77 ± 108,33	4109,92 ± 236,81	1793,64 ± 124,63	1876,88 ± 105,58	2910,91 ± 199,09
<b>5 mg fipronil/kg p.c., 5 días</b>								
<b>Aspartato</b>	6878,94 ± 593,89	4342,50 ± 161,49	5981,55 ± 384,03 * (33,10%)	7358,82 ± 555,49 *** (31,32%)	4453,46 ± 207,21	5383,02 ± 43,77	7572,60 ± 415,47	5889,59 ± 257,55
<b>Glutamato</b>	20559,15 ± 1777,26	15094,68 ± 564,84	21453,39 ± 1250,74	24490,28 ± 2463,15	10161,20 ± 572,74	8755,02 ± 381,38	13220,90 ± 610,13	13461,35 ± 76,48
<b>Glutamina</b>	2415,72 ± 224,97	1802,75 ± 47,75	3561,17 ± 96,42 ** (49,15%)	2671,43 ± 309,86 *** (54,63%)	1203,60 ± 68,83 *** (-24,59%)	2391,72 ± 176,23	2004,87 ± 157,73 ** (77,44%)	1630,35 ± 15,37 ** (47,06%)
<b>Taurina</b>	5494,72 ± 444,11	4658,30 ± 342,24	8707,95 ± 691,58	6620,62 ± 778,96	1798,91 ± 86,06 *** (-16,96%)	6587,91 ± 277,37	2021,08 ± 130,36	1824,17 ± 54,61
<b>GABA</b>	2567,53 ± 204,29	2581,71 ± 74,67	5505,46 ± 128,95 *** (104,23%)	4907,97 ± 502,04 *** (107,54%)	4024,83 ± 182,07	2126,88 ± 109,23	3304,28 ± 253,50 ** (76,05%)	3670,04 ± 81,46 *** (26,08%)
<b>10 mg fipronil/kg p.c., 5 días</b>								
<b>Aspartato</b>	7011,04 ± 565,64	3395,41 ± 283,08 *** (-13,70%)	6046,22 ± 571,14 * (34,54%)	7214,52 ± 415,71 *** (28,75%)	4248,73 ± 243,37 *** (-15,16%)	5307,19 ± 217,79	6256,06 ± 535,67	6734 ± 500,17 ** (20,15%)
<b>Glutamato</b>	20700,47 ± 1599,30	12379,75 ± 368,19 *** (-12,25%)	23720,71 ± 1027,88 * (27,81%)	30550,12 ± 629,07 *** (49,73%)	10041,48 ± 114,01	8626,85 ± 406,87	12160,02 ± 919,83	15705,61 ± 302,50 * (27,35%)
<b>Glutamina</b>	2461,58 ± 228,14	1487,76 ± 35,25 *** (-17,48%)	3497,81 ± 226,15 ** (46,49%)	2939,25 ± 127,25 *** (70,14%)	1287,82 ± 50,81 *** (-19,31%)	3235,27 ± 78,99 *** (56,50%)	1523,13 ± 72,85	1873,86 ± 222,28 ** (69,02%)
<b>Taurina</b>	5391,61 ± 382,37	4202,05 ± 195,11	10189,93 ± 615,35	6871,84 ± 107,50 *** (28,32%)	1623,03 ± 49,13 *** (-25,08%)	6095,99 ± 364,98	1678,13 ± 179,25	2393,60 ± 19,50 *** (17,40%)
<b>GABA</b>	2642,48 ± 232,39	2401,07 ± 99,73	4324,05 ± 267,44 *** (60,40%)	3929,70 ± 17,28 *** (66,18%)	3696,02 ± 269,81	2030,67 ± 125,65	2145,73 ± 208,88	4461,34 ± 277,48 *** (53,26%)
<b>15 mg fipronil/kg p.c., 5 días</b>								
<b>Aspartato</b>	7272,02 ± 870,00	1174,58 ± 71,71 *** (-70,15%)	6061,79 ± 252,23 * (34,89%)	14835,95 ± 617,76 *** (164,75%)	1939,99 ± 216,18 *** (-61,26%)	2402,26 ± 189,48 *** (-50,81%)	6867,87 ± 553,25	7229,71 ± 296,82 ** (29,00%)
<b>Glutamato</b>	19585,11 ± 1313,79	3961,56 ± 136,65 *** (-71,92%)	22111,64 ± 864,76 * (19,14%)	45916,44 ± 3387,57 *** (125,04%)	3845,20 ± 247,86 *** (-65,21%)	3807,16 ± 303,61 *** (-53,65%)	12430,50 ± 998,35	16222,49 ± 1363,68 * (31,54%)
<b>Glutamina</b>	2723,80 ± 151,96	521,76 ± 17,53 *** (-71,06%)	3110,73 ± 195,28 ** (30,28%)	5327,56 ± 167,82 *** (208,38%)	681,13 ± 18,24 *** (-57,32%)	3428,58 ± 161,10 *** (65,85%)	1723,72 ± 196,46 ** (52,56%)	2072,21 ± 49,82 ** (86,92%)
<b>Taurina</b>	7546,35 ± 754,74 * (28,31%)	1281,88 ± 45,81 *** (-72,22%)	8928,64 ± 357,10	13147,11 ± 474,11 *** (145,50%)	729,16 ± 32,78 *** (-66,34%)	2182,90 ± 192,24 *** (-65,61%)	1771,82 ± 170,19	3135,52 ± 68,35 *** (53,79%)
<b>GABA</b>	4944,08 ± 261,64 *** (92,62%)	916,31 ± 70,12 *** (-59,98%)	3640,83 ± 183,72 *** (35,06%)	7522,01 ± 376,23 *** (218,09%)	1896,75 ± 67,26 *** (-53,85%)	1043,64 ± 62,02 *** (-41,81%)	2444,57 ± 231,45	6104,78 ± 223,91 *** (109,72%)

**Tabla 22. Efecto del fipronil sobre la concentración de aminoácidos neurotransmisores aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA tras administración oral de 5 mg, 10 y 15 mg/kg p.c. /día durante 5 días en SNC.** Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  y \*\*\* $P < 0,001$



## ***DISCUSIÓN***



## 4. *DISCUSIÓN*

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo de acción neurotóxico del fipronil, en la presente Tesis Doctoral, nos hemos planteado evaluar el efecto de este insecticida sobre el contenido de los aminoácidos glutamina, glutamato, aspartato, taurina y GABA en varias regiones cerebrales de rata macho adulta, así como el efecto que ejerce el fipronil sobre el peso corporal y la ingesta de alimento tras su administración oral.

El mecanismo de acción de la mayoría de los insecticidas se basa en su selectividad neurotóxica, bloqueando distintos canales iónicos del sistema nervioso central (SNC) (Bloomquist, 1996 y 2001). Pese a la toxicidad selectiva que parece presentar el fipronil sobre los receptores GABAérgicos de insectos (mil veces mayor que en humanos) (Ratra *et al.*, 2001), existe una información limitada sobre su afinidad frente a otros aminoácidos en el SNC, lo que hace que el interés de este plaguicida cobre gran importancia desde el punto de vista toxicológico a efectos de análisis del riesgo.

Dado el amplio uso del fipronil, cada vez existen más datos de una gran variedad de efectos tóxicos en animales y en el hombre. Hoy en día todos los efectos se vienen dirigiendo con el importante papel que juega el estrés oxidativo por generación de ROS y el daño oxidativo a nivel de ADN como posible mecanismo de toxicidad inducida por fipronil así como de su metabolismo (Wang *et al.*, 2016). El estrés oxidativo es causa de un gran número de respuestas biológicas y fases de señalización celular. Los principales tipos de toxicidad inducida por fipronil son muy diversos, e incluyen espermatoxicidad, hepatotoxicidad, retraso de crecimiento y neurotoxicidad. En ensayos de toxicidad, se ha demostrado que ratones sometidos a exposiciones orales crónicas de fipronil experimentan una pérdida de peso corporal y un descenso en el consumo de alimento (USEPA, 1996b). Recientemente, en un estudio llevado a cabo por Godinho



*et al.* (2016), tras la administración de fipronil en ratas, a una dosis de 30 mg/kg p.c./día por vía oral durante 15 días, se observó un descenso significativo en la ganancia de peso corporal. En el presente estudio, tras la administración de fipronil a dosis inferiores y una menor duración del tratamiento (10 y 15 mg/kg p.c./ 5 días), también se evidenció una reducción en el peso corporal de los animales, así como en el consumo de alimento. Previamente, se ha relacionado una modificación en el equilibrio GABAérgico con alteraciones en la ingestión de los alimentos al microinyectar GABA directamente en el hipotálamo, puesto que el fipronil parece actuar a este nivel bloqueando la estimulación del apetito a través de la 2-desoxiglucosa (Ahlskog y Hoebel, 1992), lo que podría sugerir que las alteraciones observadas en nuestro estudio en los niveles de GABA del hipotálamo podrían también relacionarse con el bloqueo de la estimulación del apetito.

A la vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo, y tras el tratamiento de ratas Wistar con fipronil por vía oral, a las dosis de 5, 10 y 15 mg/kg p.c./día durante 5 días, se puede afirmar, de manera global, que el fipronil ejerce, en la mayoría de los tejidos cerebrales estudiados (hipotálamo, cerebelo, hipocampo, cuerpo estriado y mesencéfalo), un efecto dosis respuesta. Estudios previos con fipronil evaluaron en ratas cambios en los electroencefalogramas, encontrando que a dosis de 25 y 50 mg/kg p.c. el fipronil era capaz de generar alteraciones dosis dependientes (Freeborn *et al.*, 2014). En el presente estudio, tras tratar oralmente a las ratas con las dosis más altas (10 y 15 mg/kg) se observa además una serie de signos clínicos de intoxicación, que cursaban con convulsiones menores y temblores aproximadamente entre 2 y 3 horas post-tratamiento. Estos signos fueron reversibles y desaparecieron en unos 60 minutos tras su inicio sin producir la muerte de ningún animal, lo que coincide con estudios previos realizados con fipronil en los que también se observaron convulsiones en los animales objeto de estudio (Szegedi *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2006; Freeborn *et al.*, 2015), de manera que las convulsiones aparecen como uno de los signos característicos por intoxicación con fipronil.

En el presente estudio, tras la exposición oral al fipronil, podemos resaltar que se observaron dos respuestas neurotóxicas distintas en base al contenido de los aminoácidos evaluados y, en función de las regiones cerebrales analizadas, efectos no descritos en la literatura científica. En cerebelo, cuerpo estriado y mesencéfalo de manera global, se evidenció un aumento de las concentraciones de los aminoácidos objeto de estudio y, por el contrario, en hipófisis, hipotálamo e hipocampo se detectó una disminución de las concentraciones de dichos aminoácidos. Asimismo, tras la administración de una dosis de 15 mg/kg en la corteza cerebral, el fipronil indujo un aumento de la concentración de GABA.

Un estudio reciente, llevado a cabo en un modelo *in vivo* de ratas macho Wistar, concluyó que tras sufrir los animales un traumatismo cerebral severo, se detectó un incremento en el número de aminoácidos excitadores (glutamato, glutamina y aspartato) (Amorini *et al.*, 2017). Bajo estas condiciones experimentales, el ciclo metabólico Glutamato-Glutamina (Glu/Gln) entre neuronas y astrocitos sería alterado dando lugar a un aumento de la relación Glu/Gln postraumático, lo que implica una disminución de la tasa de eliminación de la concentración de glutamato extracelular tras un incremento de calcio intracelular dependiente de los receptores *N*-metil-d-aspartato (NMDA) (Brouillet *et al.*, 1999). La sobrecarga de calcio intracelular unido a un incremento de glutamato en el espacio sináptico es una etapa clave en los procesos de neurodegeneración (Khadrawy *et al.*, 2017). Cabe destacar un aumento estadísticamente significativo de los niveles de aspartato, aminoácido que se transforma en glutamato por la acción catalítica de la aspartato aminotransferasa (AST) (Cooper y Jeitner, 2016). La acción metabólica a través de la reacción catalítica de AST contribuiría a incrementar todavía más los niveles extracelulares de glutamato. El aumento en el contenido de glutamato, glutamina y aspartato, tras la administración de fipronil, se ha observado en nuestro estudio a nivel de cerebelo, cuerpo estriado y mesencéfalo, lo que sugiere que una de sus principales acciones tóxicas del fipronil sobre estas regiones cerebrales pueda deberse a una disrupción del ciclo metabólico Glutamato-Glutamina causado por una sobreactivación de los receptores de glutamato en estas tres regiones debido a un mecanismo de

excitotoxicidad por activación masiva de los receptores de glutamato como consecuencia de una alteración en el ciclo Glutamato-Glutamina.

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC (Cooper y Jeitner, 2016) y se distribuye de una manera ubícua (El Idrissi *et al.*, 2013). Entre sus múltiples funciones, cabe destacar la participación del GABA en los mecanismos de defensa neuronales impidiendo una sobreactivación inducida por glutamato (El Idrissi *et al.*, 2013). El GABA también forma parte del ciclo metabólico GABA-Glutamato-Glutamina entre neuronas y astrocitos (Cooper y Jeitner, 2016; Guerriero *et al.*, 2015); las neuronas GABAérgicas sintetizan GABA a partir de glutamato, que luego liberan al espacio extracelular para modular los procesos de neurotransmisión. Los astrocitos a su vez, recaptan el glutamato en exceso y el GABA, y a través de la acción catalítica de la GABA transaminasa y de la glutamina sintetasa, se genera glutamina. En un estudio reciente, se evidenció un incremento en los niveles de GABA como respuesta a la excitotoxicidad inducida por glutamato Amorini *et al.* (2017). A la vista de nuestros resultados obtenidos, el aumento en el contenido de GABA observado en nuestro estudio que se produce a nivel del cuerpo estriado, cerebelo, mesencéfalo, bulbo raquídeo y corteza cerebral, nos permite concluir que tras la administración oral de fipronil, se inicia un mecanismo fisiológico compensatorio en dichas regiones cerebrales aumentando los niveles de GABA, en un intento de contrarrestar la excitotoxicidad inducida por fipronil.

La taurina es un aminoácido neuromodulador inhibitorio con elevada presencia en el cerebro, músculo esquelético y músculo cardíaco y, alcanza sus mayores concentraciones a nivel del SNC en corteza, cerebelo, cuerpo estriado y núcleo supraóptico del hipotálamo, en los cuales aumenta la conductancia para el Cl<sup>-</sup> y actúa como una molécula hiperpolarizante por su acción sobre los receptores de GABA y glicina (Molchanova *et al.*, 2007). La taurina es responsable de regular numerosos procesos celulares tales como la neuromodulación, los mecanismos de

neurotransmisión, y la modulación de funciones dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Cooper y Jeitner, 2016). Además, presenta un destacado papel como antioxidante (Paula-Lima *et al.*, 2005) y frente a procesos de estrés celular (Wu *et al.*, 1998), interviniendo en el control de la osmolaridad cerebral y manteniendo la integridad estructural de las membranas celulares (Choe *et al.*, 2012; Baslow, 2002; Oenarto *et al.*, 2014), y contrarrestando la excitotoxicidad inducida por glutamato (Wu y Prentice, 2010; Kim *et al.*, 2014; Amorini *et al.*, 2017). En los últimos años, las investigaciones llevadas a cabo con este aminoácido inhibitorio han elevado su valor terapéutico en modelos animales frente a procesos neurodegenerativos (Prentice *et al.*, 2015).

En nuestros resultados, tras la administración oral de fipronil evidenciamos un incremento dosis-dependiente de los niveles de taurina en mesencéfalo, cerebelo y corteza cerebral. Estos datos se correlacionan con resultados recientes llevados a cabo por Amorini *et al.* (2017), en los que las concentraciones de taurina, al igual que el GABA, se incrementaron significativamente, tras la inducción experimental de daño traumático cerebral, lo cual favorece su interacción con el receptor NMDA compitiendo por su unión con el glutamato (Chan *et al.*, 2013).

Dado que el proceso de excitotoxicidad tiene una importancia capital en los mecanismos de muerte neuronal implicados en situaciones patológicas como traumatismos, ictus, epilepsia, lesiones cerebrales perinatales, y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington o la enfermedad de Parkinson (Prentice *et al.*, 2015; Cooper y Jeitner, 2016; Godinho *et al.*, 2016; Amorini *et al.*, 2017), cabe señalar que el aumento de glutamato inducido tras la administración oral de fipronil en la mayor parte de los tejidos cerebrales estudiados conlleva un riesgo intrínseco de daño neuronal, proporcional al aumento de este neurotransmisor en cada una de las regiones, el cual puede verse modulado a su vez, por el incremento de taurina y GABA.

El cuerpo estriado es la principal vía de información hacia los ganglios basales (Murray *et al.*, 2011), recibe aferencias de la corteza cerebral, del tálamo óptico y de la sustancia negra del mesencéfalo. Su principal función se encuentra relacionada con los movimientos de grupos musculares regulados por la corteza cerebral (Báez-Mendoza y Schultz, 2013), mostrando actividad relacionada con el inicio, progreso y ejecución de la marcha (Hollerman *et al.*, 2000). Es precisamente en el cuerpo estriado donde podemos encontrar un mayor número de interneuronas GABAérgicas, y mayores concentraciones de GABA (Báez-Mendoza y Schultz, 2013; Molchanova *et al.*, 2007; Calabresi *et al.*, 2000). La desregulación de este tejido cerebral ha sido implicada en el desarrollo de diversas patologías neurodegenerativas, siendo una de ellas la enfermedad de Huntington, caracterizada por movimientos anormales, déficits cognitivos y manifestaciones psiquiátricas asociadas con atrofia estriatal progresiva (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Brouillet *et al.* (1999), demostraron como las lesiones excitotóxicas en el cuerpo estriado en ratas, ocasionaban un comportamiento similar al que se produce en el Huntington en lo relativo a déficits motores y cognitivos. En esta misma línea, y basándonos en los resultados obtenidos en nuestro estudio tras la administración oral de fipronil a dosis de 10 y 15 mg/kg en ratas macho adultas, observamos que los animales exhibieron alteraciones motoras en forma de temblores, además de cuantificarse, a nivel del cuerpo estriado, un incremento en los niveles de todos los aminoácidos analizados, principalmente del GABA, lo que podría ser un fiel reflejo de la actividad excitatoria inducida por fipronil y la falta de mecanismos fisiológicos compensatorios traducido en una depleción de las reservas de GABA, tal y como ocurre en la enfermedad de Huntington.

El cerebelo se encuentra implicado en procesos que regulan el comportamiento, las emociones, los procesos cognitivos complejos, y/o la coordinación motora (Schmahmann, 1997). Contribuye al control de los movimientos voluntarios, proporcionándoles precisión y coordinación. Además regula y coordina la contracción de la musculatura esquelética, siendo esencial para el mantenimiento de la postura y el equilibrio. Es por ello que los signos de daño

cerebelar están relacionados con la ataxia o incoordinación motora (Morton y Bastian, 2004). Se conoce que la neurotoxicidad del fipronil se caracteriza por una hiperexcitación del SNC, seguida de convulsiones (Das *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2016). Pues bien, a nivel del cerebelo, y tras la administración oral de fipronil a las dosis de 5, 10 y 15 mg/kg p.c. en ratas macho adultas, encontramos un aumento del contenido de todos los aminoácidos analizados, evidenciándose una clara hiperactividad y disrupción cerebelar que, en consecuencia, podría ser la responsable de las convulsiones y temblores observados durante todo el periodo experimental.

El mesencéfalo, es la estructura superior del tronco del encéfalo y se encuentra formado anatómicamente por dos estructuras fundamentales, que son el tectum, y el tegmentum que contiene tres regiones principales: la sustancia negra, que posee funciones vinculadas especialmente con los movimientos y tono muscular, la sustancia gris periacueductal, que interviene en la habituación al dolor y en los procesos analgésicos en general y el núcleo rojo, relacionado con la coordinación de movimientos (Felten y Shetten, 2010). Cualquier lesión a este nivel tiene casi siempre consecuencias muy graves, debido a su importancia para lograr coordinar funciones fisiológicas básicas del organismo. Dado que el mesencéfalo actúa como nexo de unión entre muchas áreas, la presencia de anomalías en esta zona afecta a muchas otras (Breedlove *et al.*, 2010). En nuestro estudio, la administración oral de fipronil a las dosis más altas ensayadas (10 y 15 mg/kg p.c.) en ratas macho adultas incrementó los niveles de todos los aminoácidos analizados en mesencéfalo. El GABA sufre el aumento más notable, al igual que lo observado a nivel del cuerpo estriado. Estudios previos evidenciaron un incremento en la liberación mesencefálica de glutamato, taurina y GABA tras la administración de un analgésico inhibidor de canales de Na<sup>+</sup> (Reeno *et al.* 2008; Renno *et al.*, 1992). Mientras el glutamato actúa activando los sistemas analgésicos en mesencéfalo, alrededor de un 40 % de las terminaciones nerviosas que llegan a esta región se encuentran bajo el control inhibitorio del GABA, a través del que se ejerce la modulación del dolor (Millan, 2002; Soliemani *et al.*, 2016; Morgan *et al.*, 2003). La acción neurotóxica que induce el fipronil a nivel del mesencéfalo, teniendo en cuenta el aumento

en la concentración de todos los aminoácidos analizados, quizás sea como consecuencia de un mecanismo de sobreactivación y excitotoxicidad en el que el GABA, y en menor medida la taurina, traten de equilibrar la homeostasis del proceso de neurotransmisión aminoacidérgica y mitigar así el daño celular neuronal. En referencia a la nocicepción, el incremento en los niveles de glutamato con respecto a los de aspartato tras la administración oral de fipronil nos indica que existe un mecanismo modulador del dolor que se induce en nuestro modelo para atenuar, en parte, los efectos debidos a la exposición del fipronil.

El hipocampo forma parte del sistema límbico (Liu *et al.*, 2017) y desempeña un papel esencial en los procesos de aprendizaje y memoria (Chanyang *et al.*, 2017). Una lesión en esta región cerebral produce amnesia anterógrada, como ocurre en enfermedades como la demencia o el Alzheimer, sin afectar al aprendizaje de nuevas capacidades o habilidades (López-Pousa *et al.*, 2002). Recibe aferencias del córtex, y a su vez envía señales neuronales al hipotálamo y al área septal a través del fórnix (Drew *et al.*, 2013).

La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia senil. Afecta, sobre todo, a la población de más de 65 años de edad (Fratiglioni *et al.*, 1999; Small *et al.*, 1997; Sosa-Ortiz *et al.*, 2012; Winblad *et al.*, 2016). Con el progresivo envejecimiento de la población, la incidencia de las demencias como el Alzheimer están aumentando rápidamente, constituyendo un verdadero problema para la sociedad. Los factores genéticos sólo desempeñan un pequeño papel en la etiología del Alzheimer (Dosunmu *et al.*, 2007), mientras que los pesticidas, la contaminación atmosférica, los metales pesados, los hábitos de vida y alimentarios y otros factores ambientales cada vez cobran una mayor relevancia en este sentido. Hay estudios que demuestran que la incidencia de enfermedades neurodegenerativas es significativamente superior en trabajadores frecuentemente expuestos a pesticidas (Henderson, 1988; Baldi *et al.*, 2003). También está descrito que poblaciones que viven en áreas con un elevado uso de pesticidas

presentan un mayor riesgo de desarrollar patologías del tipo Alzheimer, independientemente de la edad y sexo (Parrón *et al.*, 2011). Estos estudios epidemiológicos sugieren que la exposición a pesticidas es un factor de riesgo de cara a desarrollar Alzheimer (Baldi *et al.*, 2003). Chen *et al.* (2007) relacionaron, por primera vez, la exposición a pesticidas con déficits de memoria debidos al descenso en el número de neuronas tanto en el hipocampo como en la corteza frontal de ratas macho adultas. A la luz de estos hallazgos, recientemente se ha relacionado la exposición a plaguicidas en ratas con el aumento de la incidencia de enfermedades neurodegenerativas tales como el Parkinson, el Alzheimer y la esclerosis múltiple (Godinho *et al.*, 2016). En concreto, tras la administración oral de una dosis de 30 mg/kg de fipronil durante 15 días consecutivos se observó, fisiológicamente, una disrupción en la función neurotransmisora del GABA a través del bloqueo de receptores GABA<sub>A</sub> y un descenso en los niveles del GABA, y cognitivamente, una reducción en la capacidad de memoria de los animales. Los autores concluyeron que la acción neurotóxica del fipronil afectaba fundamentalmente a la adquisición, consolidación y evocación en las fases de la memoria que residen en el hipocampo, que, además, es una región cerebral con abundantes receptores GABAérgicos (Davis, 1993). En el presente estudio, tras la administración oral de fipronil en ratas macho adultas a dosis más bajas que las seleccionadas por Godinho *et al.* (2016) durante 5 días consecutivos, observamos un descenso generalizado a nivel del hipocampo de todos los aminoácidos analizados. La reducción en el contenido de aminoácidos es proporcional a la dosis administrada, siendo este descenso mayor a la dosis de 15 mg/kg, lo cual indica una afectación generalizada de la función hipocampal. Recientemente, la administración de fipronil en ratas lactantes no sólo causó un trastorno del desarrollo neurológico, sino que indujo un déficit de memoria a corto y largo plazo (Montanha *et al.*, 2016) lo que confirmaría aún más, si cabe, la hipótesis que correlaciona la exposición a pesticidas y el potencial desarrollo de patologías neurodegenerativas.

El hipotálamo está implicado en la regulación de funciones complejas entre las que se encuentran la memoria, la regulación de los ritmos circadianos y el ciclo de sueño y vigilia, la



regulación de los sistemas simpático y parasimpático y el control de la bebida e ingesta de alimento (Snell, 2006). El hipotálamo, a su vez, se comunica con la glándula hipofisaria a través del tallo hipofisario, un tracto nervioso altamente vascularizado (Alcaraz, 2001). Su actividad está regulada por el hipotálamo, ejerciendo una acción inhibitoria o excitadora sobre la hipófisis. La actividad aminoacidérgica en el hipotálamo e hipófisis es similar debido a su íntima relación metabólica. Tras la administración oral de fipronil, observamos en nuestros resultados un descenso en el contenido de todos los aminoácidos analizados en ambas regiones cerebrales con la excepción de la glutamina, cuyos niveles experimentaron un incremento a nivel hipofisario. Este cambio en los niveles de glutamina podría deberse a un mecanismo de compensación del daño causado por el fipronil en estas regiones, al igual que lo observado recientemente por Varol *et al.* (2016), cuyos resultados demostraron que la L-glutamina posee un efecto antioxidante neuroprotector en los tejidos cerebrales dañados tras la exposición en ratas a una única dosis oral de deltametrín (35 mg/kg). A la vista de nuestros resultados, podemos sugerir que, aunque la exposición oral al fipronil parece causar un daño neuronal en el hipotálamo y la hipófisis tras los 5 días de administración, la glutamina aún podría estar tratando de compensar el daño producido. Por tanto, estas alteraciones observadas en los neurotransmisores de esta región podrían desencadenar alteraciones en la memoria relacionadas con el Alzheimer (Godinho *et al.*, 2016), tal y como hemos visto en los estudios epidemiológicos de exposición a pesticidas anteriormente descritos.

Para concluir, y asociando los resultados obtenidos en la hipófisis, hipotálamo e hipocampo, se puede afirmar, de forma global, que la exposición oral de fipronil es capaz de alterar la neurotransmisión aminoacidérgica en estas tres regiones cerebrales interrelacionadas, dado que el hipocampo envía proyecciones vía hipotálamo y éste a su vez conecta con la hipófisis, provocando un descenso generalizado de los niveles de los aminoácidos analizados.

La corteza cerebral se encuentra dividida en cuatro grandes lóbulos: frontal, parietal, temporal y occipital (Snell, 2006). Dentro del lóbulo frontal destaca la corteza prefrontal (CPF), que va a constituir el 30 % de la superficie total de la corteza cerebral (Davidson *et al.*, 2000). Desempeña importantes funciones como la integración y el procesamiento de señales emotivas, cognitivas y motoras (Bechara *et al.*, 2000). En nuestro estudio hemos podido observar un aumento significativo de los niveles de los aminoácidos taurina y GABA en la corteza cerebral a la dosis de 15 mg/kg p.c., lo que podría indicar un intento de regulación del equilibrio aminoacidérgico alterado por el tratamiento oral con fipronil.

Como hemos descrito anteriormente, la taurina y el GABA se liberan de forma fisiológica por las neuronas en respuesta a la excitotoxicidad glutamatérgica (Paula-Lima *et al.*, 2005), sugiriendo que ambos aminoácidos forman parte de los mecanismos de defensa neuronal para compensar la sobreactivación glutamatérgica. Asimismo, múltiples evidencias indican disrupción GABAérgica en la enfermedad de Alzheimer, con reducción de las concentraciones del GABA en corteza frontal, temporal y parietal (Lancôt *et al.*, 2009). Tras la exposición oral al fipronil, hemos observado una alteración de la función GABAérgica, que aunque en el caso de la corteza ha dado lugar a un aumento en los niveles de GABA, en el caso de la hipófisis, hipotálamo e hipocampo originó una disminución, que tomado en conjunto podría relacionarse con alteraciones similares a las descritas para enfermedades neurodegenerativas.

En general se admite un papel neuromodulador que ejercen la taurina y el GABA; en nuestro estudio el aumento significativo de los niveles de ambos aminoácidos a nivel cortical pudiera producirse en un intento de contrarrestar los daños producidos por un inicio de destrucción neuronal en fases tempranas, destrucción que podría corresponderse con la disminución observada a nivel de aspartato y glutamato en esta región. El fipronil a este nivel podría estar produciendo alteraciones de la función cognitiva, que sería muy interesante valorar con estudios específicos de comportamiento.

En resumen, las alteraciones producidas en los niveles de aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA por la exposición oral al fipronil han mostrado una disrupción a nivel aminoacídico en todos los tejidos cerebrales de estudio, lo que puede conllevar a potenciales desórdenes neurodegenerativos similares en su comportamiento a enfermedades de tipo Parkinsoniano, Alzheimer o demencias derivadas de la destrucción neuronal producida, demostrando que el fipronil puede producir daños a nivel del SNC en consonancia con los estudios que indican este tipo de alteraciones surgidas como consecuencia del uso de otros pesticidas. Posteriores estudios, no solo implicando efectos neuroquímicos sino también neurofisiológicos y de biología molecular, deben confirmar este nuevo mecanismo de excitotoxicidad que conllevaría muerte neuronal, sugerido para el fipronil en el presente estudio.

## ***CONCLUSIONES***



## 5. *CONCLUSIONES*

1. El presente trabajo de investigación demuestra que la administración oral de fipronil, a las dosis de 5, 10 y 15 mg/kg p.c., durante 5 días consecutivos, en ratas Wistar macho adultas altera en el SNC los niveles de los aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA. Hasta la fecha, es el primer trabajo que describe los efectos que este plaguicida produce sobre la concentración aminoacidérgica en distintas regiones cerebrales. Estos nuevos datos aportan información relevante acerca de un nuevo mecanismo de acción neurotóxica del fipronil.
2. La administración oral de fipronil en ratas macho adultas a las dosis de 10 y 15 mg/kg p.c. durante 5 días consecutivos causó un descenso estadísticamente significativo sobre la totalidad de alimento ingerido.
3. La administración oral de fipronil en ratas macho adultas a las dosis de 10 y 15 mg/kg p.c. durante 5 días consecutivos causó un descenso estadísticamente significativo sobre la ganancia de peso corporal.
4. El fipronil, a todas las dosis estudiadas (5, 10 y 15 mg/kg p.c., durante 5 días) induce alteraciones, dosis-dependientes, de los niveles de los aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA en los tejidos cerebrales hipotálamo, cerebelo, hipocampo, cuerpo estriado y mesencéfalo.
5. En términos globales, la administración oral de fipronil en rata macho adulta induce:
  - 5.1 Un aumento estadísticamente significativo de las concentraciones de los aminoácidos neurotransmisores aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA en las regiones cerebrales cerebelo, cuerpo estriado y mesencéfalo.

- 5.2 Una disminución estadísticamente significativa de las concentraciones de los aminoácidos neurotransmisores aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA en las regiones cerebrales hipófisis, hipotálamo e hipocampo.
- 5.3 Un aumento estadísticamente significativo de las concentraciones de los aminoácidos taurina y GABA en corteza cerebral a la dosis de 15 mg/kg p.c.
6. A partir de este estudio de neurotoxicidad, tras la exposición oral de fipronil, a efectos de evaluación del riesgo toxicológico, se puede identificar un LOAEL de 5 mg/kg p.c./día, siendo los puntos críticos toxicológicos una disminución del consumo de alimento, una disminución de los niveles de los aminoácidos glutamina y taurina en hipotálamo, un aumento de los niveles de glutamina y GABA en cerebelo, cuerpo estriado y mesencéfalo.
7. Tras la administración oral de fipronil, se observó una disrupción del balance homeostático en el contenido de los aminoácidos analizados, así como en la regulación de su metabolismo. Esta perturbación podría favorecer la interrupción de los procesos de transmisión sináptica, hiperexcitación y en último término la muerte neuronal.
8. Las alteraciones causadas tras la administración oral de fipronil a las dosis de 5, 10 y 15 mg/kg p.c. durante 5 días consecutivos sobre el contenido de los aminoácidos estudiados, aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA en distintas regiones cerebrales es una evidencia más que apoya la hipótesis que sugiere una posible relación entre la exposición a pesticidas tipo fipronil y el desarrollo de patologías que cursan con un patrón neurodegenerativo.

## ***BIBLIOGRAFÍA***





## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ABALIS, I.M., ELDEFAWI, A.T. & ELDEFAWI, M.E. (1986). Actions of avermectin B1a on the gamma-aminobutyric acid A receptor and chloride channels in rat brain. *Journal of Biochemical Toxicology*, **1**, 69-82.
- ABDALLAHI, E., ADÁN, A. & VIÑUELA, E. (2000). Estudio de la actividad de piriproxifen y fipronil sobre *Opius concolor Szèpliget* (Hymenoptera: Braconidae) y su huésped de sustitución *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, **26**, 503-511.
- AHLISKOG, J.E. & HOEBEL, B.G. (1992). Overeating and obesity from damage to a noradrenergic system in the brain. *Science*, **182**, 166 - 169.
- ALCARAZ ROMERO, V.M. (2001). Estructura y función del sistema nervioso: recepción sensorial y estados del organismo. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. (México D.F.), 65-106.
- ALI, A., NAYAR, J.K. & GU, W.D. (1998). Toxicity of a phenyl pyrazole insecticide, fipronil, to mosquito and chironomid midge larvae in the laboratory. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **14**, 216-218.
- ALI, A., CHOWDHURY, M.A., HOSSAIN, M.I., AMEEN, M.U., HABIBA, D.B. & ASLAM, A.F.M. (1999). Laboratory evaluation of selected larvicides and insect growth regulators against field-collected *Culex quinquefasciatus* larvae from urban Dhaka, Bangladesh. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **15**, 43-47.
- AMORINI, A.M., LAZZARINO, G., DI PIETRO, V., SIGNORETTI, S., LAZZARINO, G., BELLI, A. & TAVAZZI, B. (2017). Severity of experimental traumatic brain injury modulates changes in concentrations of cerebral free amino acids. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **21**, 530-542.
- ANDREWS, F.J. & GRIFFITHS, R.D. (2002). Glutamine: Essential for immune nutrition in the critically ill. *British Journal of Nutrition*, **51**, 3-8.
- ANTHONY, N., UNRUH, T., GANSER, D. & FFRENCH-CONSTANT, R. (1998). Duplication of the Rdl GABA receptor subunit gene in an insecticide-resistant aphid, *Myzus persicae*. *Molecular Genetics and Genomics*, **260**, 165-175.
- ARAÚJO, F.R., SILVA, M.P., LOPES, A.A., RIBEIRO, O.C., PIRES, P.P., CARVALHO, C.M.E., BALBUENA, C.B., VILLAS, A.A. & RAMOS, J.K.M. (1998). Severe cat flea infestation of dairy calves in Brazil. *Veterinary Parasitology*, **80**, 83-86.

- ARONSTEIN, K. & FFRENCH-CONSTANT, R. (1995). Immunocytochemistry of a novel GABA receptor subunit Rdl in *Drosophila melanogaster*. *Invertebrate Neuroscience*, **1**, 25–31.
- ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B., HOEY, B.M. & BUTLER, J. (1988). The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursor. *Biochemical Journal*, **256**, 251-255.
- AUGHTON, P. (1993). MB 46030: combined oncogenicity and toxicity study by dietary administration to CD rats for 104 weeks, including a 13 week reversibility period on completion of 52 weeks of treatment. Report No. 93/RHA432/0166. Pharmaco LSR Ltd. Estudio confidencial..
- AUGUSTINACK, J.C., VAN DER KOUWE, A.J., BLACKWELL, M.L., SALAT, D.H., WIGGINS, C.J., FROSC, M.P., WIGGINS, G.C., POTTHAST, A., WALD, L.L. & FISCHL, B.R. (2005). Detection of entorhinal layer II using Tesla magnetic resonance imaging. *Annals of Neurology*, **57**, 489–494.
- BÁEZ-MENDOZA, R. & SCHULTZ, W. (2013). The role of the striatum in social behavior. *Frontiers of Neuroscience*, **7**, 233.
- BALDI, I., LEBAILLY, P., MOHAMMED-BRAHIM, B., LETENNEUR, L., DARTIGUES, J.F., BROCHARD, P. (2003). Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. *American Journal of Epidemiology*, **157**, 409-414.
- BARNARD, E.A., SKOLNICK, P., OLSEN, R.W., MÖHLER, H., SIEGHART, W., BIGGIO, G., BRAESTRUP, C., BATESON, A.N. & LANGER, S.Z. (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacological Reviews*, **50**, 291-313.
- BARNARD, E.A. (2000). The molecular architecture of GABA<sub>A</sub> receptors. In: *Handbook of Experimental Pharmacology. Pharmacology of GABA and Glycine Neurotransmission*. Vol. 150, Möhler, H. (Ed.), Springer, Berlin, pp. 79-100.
- BARNES, G.N. & SLEVIN, J.T. (2003). Ionotropic glutamate receptor biology: effect on synaptic connectivity and function in neurological disease. *Current Medicinal Chemistry*, **10**, 2059-2072.
- BASF (2003). Regente®: hoja de seguridad según 91/155/CEE de 4 de julio de 2003.
- BASLOW, M.H. (2002). Evidence supporting a role for n-acetyl-l-aspartate as a molecular water pump in myelinated neurons in the central nervous system. An analytical review. *Neurochemistry International*, **40**, 295–300.

- BASS, C., SCHROEDER, I., TURBERG, A., FIELD, L.M. & WILLIAMSON, M.S. (2004). Identification of the Rdl mutation in laboratory and field strains of the cat flea, *ctenopcephalides felis* (siphonaptera: pulicidae). *Pest Management Science*, **60**, 1157–1162.
- BATTAGLIOLI, G. & MARTIN, D.L. (1991). GABA synthesis in brain slices is dependent on glutamine produced in astrocytes. *Neurochemical Research*, **16**, 151–156.
- BAZEMORE, A.W., ELLIOTT, K.A.C. & FLOREY, E. (1956). Factor I and gamma-amino-butyric acid. *Nature*, **178**, 1052-1053.
- BECHARA, A., DAMASIO, H & DAMASIO, A.R. (2000). Emotion, decision – making and the orbitofrontal cortex. *Cerebral Cortex*, **10**, 295-307.
- BELAYNEH, Y.T. (1998). Amendment III to USAID/Madagascar supplemental environmental assessment for locust control program: options for including fipronil as an anti-locust insecticide, United States Agency for International Development (USAID), Washington, D.C.
- BELHAGE, B., HANSEN, G.H., ELSTER, L. & SCHOUSBOE, A. (1998). Effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) on synaptogenesis and synaptic function. *Perspectives on Developmental Neurobiology*, **5**, 235-246.
- BENKE, D., MERTENS, S., TRZECIAK, A., GILLESSEN, D. & MÖHLER, H. (1991). GABA<sub>A</sub> receptors display association of  $\gamma$ 2-subunit with  $\alpha$ 1- and  $\beta$ 2/3 subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**, 4478-4483.
- BENKE, D., MICHEL, C. & MÖHLER, H. (1997). GABA<sub>A</sub> receptors containing the  $\alpha$ 4-subunit: prevalence, distribution, pharmacology, and subunit architecture *in situ*. *Journal of Neurochemistry*, **69**, 806-814.
- BETZ, H. (1990). Ligand-gated ion channels in the brain: the amino acid receptor superfamily. *Neuron*, **5**, 383–392.
- BIRCKEL, P., WEIL, A., GALTIER, P. & ALVINERIE, M. (1997). Plasma protein binding of fipronil and its sulfone metabolite in the dog. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20** (Suppl. 1), 79-80.
- BLEICH, S., RÖMER, K., WILTFANG, J. & KORNHUBER, J. (2003). Glutamate and the glutamate receptor system: a target for drug action. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, **18**, S33-S40.
- BLISS, T.V.P. & COLLINGRIDGE, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, **361**, 31–39.

- BLOOMQUIST, J., GRUBS, R., SODERLUND, D. & KNIPPLE D. (1991). Prolonged exposure to GABA activates GABA-chloride channels in the presence of channel-blocking convulsants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, **99**, 397-402.
- BLOOMQUIST, J. (1993). Toxicology, mode of action, and target site-mediated resistance to insecticides acting on chloride channels. *Comparative Biochemistry and Physiology. C: Comparative Pharmacology*, **106**, 301-314.
- BLOOMQUIST, J.R. (1996). Ion channels as targets for insecticides. *Annual Review of Entomology*, **41**, 163-190.
- BLOOMQUIST, J. (1998). Chemistry and toxicology of the chlorinated cyclodienes and lindane. *Reviews of Toxicology*, **2**, 333-355.
- BLOOMQUIST, J. & ROBINSON, W. (1999). Prevalence and magnitude of resistance to cyclodiene and phenylpyrazole insecticides in *Blattella germanica* and *Drosophila melanogaster*. In: *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Conference on Insect Pests in the Urban Environment*, Graficke Zavody, Hronov, pp. 27-34.
- BLOOMQUIST, J.R. (2001). GABA and glutamate receptors as biochemical sites for insecticides action. In: *Biochemical Sites of Insecticidal Action and Resistance*, Ishaaya, I. (Ed.), Springer, Berlin, pp. 17-41.
- BLUNDELL, G. & BRYDON, W.G., (1987). High performance liquid chromatography of plasma aminoacids using orthophthalaldehyde derivatisation. *Clinica Chimica Acta*, **170**, 79-83.
- BOBÉ, A., COSTE, C.M. & COOPER J-F. (1997). Factors influencing the adsorption of fipronil in soils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **45**, 4861-4865.
- BODE, B.P. (2001). Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *Journal of Nutrition*, **131**, 2475-2485.
- BONNERT, T.P., MCKERNAN, R.M., FARRAR, S., LE BOURDELLES, B., HEAVENS, R.P., SMITH, D.W., HEWSON, L., RIGBY, M.R., SIRINATHSINGHI, D.J., BROWN, N., WAFFORD, K.A. & WHITING, P.J. (1999).  $\theta$ , a novel  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 9891-9896.
- BORMANN, J. & FEIGENSPAN, A. (1995). GABA<sub>C</sub> receptors. *Trends in Neurosciences*, **18**, 515-519.

- BOWERY, N.G., COLLINS, J.F. & HILL, R.G. (1976). Bicyclic phosphorous esters that are potent convulsants and GABA antagonists. *Nature*, **261**, 601-603.
- BRADFORD, H.F., WARD, H.K., THANKI, C.M. (1983). Glutamine as neurotransmitter precursor: complementary studies in vivo and in vitro of the synthesis and release of transmitter glutamate and GABA. In: L. Hertz, E. Kvamme, E.G. McGeer and A. Schousboe, Editors, *Glutamine, Glutamate and GABA in the Central Nervous Sytem*, Alan R Liss, New York (1983), pp. 249-260.
- BRADFORD, H.F., WARD, H.K. & THOMAS, A.J. (1978). Glutamine –a major substrate for nerve endings. *Journal of Neurochemistry*, **30**, 1453–1459.
- BREEDLOVE, M., WATSON, N.V. & ROSENZWEIG, M.R. (2010). Biological Psychology, 6th Edition, pp. 45-46.
- BROADMEADOW, A. (1993). M&B 46030: oncogenicity study by dietary administration to CD-1 mice for 78 weeks. Report No. 92/RHA313/0971. Life Science Research Ltd. Estudio confidencial.
- BROOKER, A.J. & JOHN, D.M. (1991). The effect of M&B 46,030 on pregnancy of the rat. Report No. M&B 335+326/90582. Huntingdon Research Centre Ltd. Estudio confidencial.
- BROOKS, G.T. (2001). Interactions with the gamma-amminobutyric acid A-receptor: polychloroalkanes and recent congeners. In: *Handbook of Pesticide Toxicology. Vol. 2: Agents*, Krieger, R., Doull, J., Ecobichon, D., Gammon, D., Hodgson, E., Reiter, L. & Ross, J. (Eds.), Academic Press, San Diego, pp. 1131-1156.
- BROUILLET, E., CONDE, F., BEAL, M.F. & HANTRAYE, P. (1999). Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Progress in Neurobiology*, **59**(5), 427-68.
- BUCHNER, E., BADER, R., BUCHNER, S., COX, J., EMSON, P.C., FLORY, E., HEIZMANN, C.W., HEMM, S., HOFBAUER, A. & OERTEL, W.H. (1988). Cell-specific immuno-probes for the brain of normal and mutant *Drosophila melanogaster*. I. Wildtype visual system. *Cell and Tissue Research*, **253**, 357–370.
- BUCKINGHAM, S., HOSIE, A., ROUSH, R. & SATTELLE, D. (1994). Actions of agonists and convulsant antagonists on a *Drosophila melanogaster* GABA receptor (Rdl) homo-oligomer expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuroscience Letters*, **181**, 137-140.
- BUREAU, M.H. & OLSEN, R.W. (1991). Taurine acts on a subclass of GABAA receptors in mammalian brain in vitro. *European Journal of Pharmacology*, **207**, 9-16.

- CABONI, P., SAMMELSON, R.E. & CASIDA, J.E. (2003). Phenylpyrazole insecticide photochemistry, metabolism, and GABAergic action: ethiprole compared with fipronil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 7055-7061.
- CADIERGUES, M.C., CAUBET, C. & FRANC, M. (2001). Comparison of the activity of selamectin, imidacloprid and fipronil for the treatment of dogs infested experimentally with *Ctenocephalides canis* and *Ctenocephalides felis felis*. *The Veterinary Record*, **149**, 704-706.
- CALABRESI, P., CENTONZE, D., GUBELLINI, P., MARFIA, G.A., PISANI, A., SANCESARIO, G. & BERNARDI, G. (2000). Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*, **61**, 231-265.
- CARY, T.L., CHANDLER, G.T., VOLZ, D.C., WALSE, S.S. & FERRY, J.L. (2004). Phenylpyrazole insecticide fipronil induces male infertility in the estuarine meiobenthic crustacean *Amphiascus tenuiremis*. *Environmental Science & Technology*, **38**, 522-528.
- CHADWICK, A.J. (1997). Use of a 0.25 per cent fipronil pump spray formulation to treat canine cheyletiellosis. *Journal of Small Animal Practice*, **38**, 261-262.
- CHAN, C.Y., SUN, H.S., SHAH, S.M., AGOVIC, M.S., HO, I., FRIEDMAN, E. & BANERJEE, S.P. (2013). Direct interaction of taurine with the NMDA glutamate receptor subtype via multiple mechanisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **775**, 45-52.
- CHANDLER, G.T., CARY, T.L., VOLZ, D.C., WALSE, S.S., FERRY, J.L. & KLOSTERHAUS S.L. (2004). Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 117-124.
- CHANG, W.K., YANG, K.D., CHUANG, H., JAN, J.T. & SHAIQ, M.F. (2002). Glutamine protects activated human T cells from apoptosis by up-regulating glutathione and Bcl-2 levels. *Clinical Immunology*, **104**, 151.
- CHANYANG, K., SEHEE, K. & SEUNGJOON, P. (2017). Neurogenic Effects of Ghrelin on the Hippocampus. *International Journal of Molecular Sciences*, **18(3)**, 588.
- CHATTON, P.F., RAVANEL, P., TISSUT, M. & MEYRAN, J.C. (2002). Toxicity and bioaccumulation of fipronil in the nontarget arthropodan fauna associated with subalpine mosquito breeding sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **52**, 8-12.
- CHEBIB, M. & JOHNSTON, G.A.R. (1999). The "ABC" of GABA receptors: a brief review. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, **26**, 937-940.

- CHEN, W.Q., JIN, H., NGUYEN, M., CARR, J., LEE, Y.J., HSU, C.C., FAIMAN, M.D., SCHLOSS, J.W. & WU, J.-Y. (2001). Role of taurine in regulation of intracellular calcium level and neuroprotective function in cultured neurons. *Journal of Neuroscience Research*, **66**, 612-619.
- CHEN, N.N., LUO, D.J., YAO, X.Q., YU, C., WANG, Y., WANG, Q., WANG, J.Z. & LIU, G.P. (2012). Pesticides Induce Spatial Memory Deficits with Synaptic Impairments and an Imbalanced Tau Phosphorylation in Rats. *Journal of Alzheimer's Disease*, **30**, 585–594.
- CHEN, L., DURKIN, K.A. & CASIDA, J.E. (2006). Structural model for gamma-aminobutyric acid receptor noncompetitive antagonist binding: widely diverse structures fit the same site. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103** (13), 5185-90.
- CHOE, K.Y., OLSON, J.E. & BOURQUE, C.W. (2012). Taurine release by astrocytes modulates osmosensitive glycine receptor tone and excitability in the adult supraoptic nucleus. *Journal in Neuroscience*, **32**, 12518–27.
- CHODOROWSKI, Z. & ANAND, J.S. (2004). Accidental dermal and inhalation exposure with fipronil – a case report. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*, **42**, 189-190.
- COCHET, P., BICKEL, P., BROMET-PETIT, M., BORMET, N. & WEIL, A. (1997). Skin distribution of fipronil by microautoradiography following topical administration to the Beagle dog. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **22**, 211-216.
- COLE, L.M. & CASIDA, J.E. (1992). GABA-gated chloride channel: binding site for 4'-ethynyl-4-*n*[2,3-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]propylbicycloorthobenzoate ([<sup>3</sup>H]EBOB) in vertebrate brain and insect head. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **44**, 1–8.
- COLE, L.M., NICHOLSON, R.A. & CASIDA, J.E. (1993). Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pesticide Biochemistry Physiology*, **46**, 47–54.
- COLE, L.M., ROUSH, R.T. & CASIDA, J.E. (1995). *Drosophila* GABA-gated chloride channel: modified [<sup>3</sup>H]EBOB binding site associated with Ala → Ser or Gly mutants of *Rdl* subunit. *Life Sciences*, **56**, 757-765.
- COLLIOT, F., KUKOROWSKI, K.A., HAWKINS, D.W. & ROBERTS, D.A. (1992). Fipronil: a new soil and foliar broad spectrum insecticide. In: *Brighton Crop Protection Conference: Pests and Diseases Volume I*, British Crop Protection Council, Farnham, 29–34.
- COLLINS, H.L. & CALLCOTT, A.M.A. (1998). Fipronil: an ultra-low-dose bait toxicant for control of red imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Florida Entomologist*, **81**, 407-415.



- CONJARD, A., BRUN, V., MARTIN, M., BAVEREL, G. & FERRIER, B. (2002). Effect of starvation on glutamine ammoniagenesis and gluconeogenesis in isolated mouse kidney tubules. *Biochemical Journal*, **368**, 301- 308.
- COOPER, A.J. & JEITNER, T.M. (2016). Central role of glutamate metabolism in the maintenance of nitrogen homeostasis in normal and hyperammonemic brain. *Biomolecules*, **26**, 6(2).
- COOPER, P.R. & PENALIGGON, J. (1996). Use of fipronil to eliminate recurrent infestation by *Trichodectes canis* in a pack of bloodhounds. *The Veterinary Record*, **139**, 95.
- CULLY, D.F., VASSILATIS, D.K., LIU, K.K., PARESS, P.S., VAN DER PLOEG, L.H.T., SCHAEFFER, J.S. & ARENA, J.P. (1994). Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **371**, 707-711.
- CULLY, D.F., PARESS, P.S., LIU, K.K., SCHAEFFER, J.M. & ARENA, J.P. (1996). Identification of a *Drosophila melanogaster* glutamate-gated chloride channel sensitive to the antiparasitic agent avermectin. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 20187–91.
- CURI, R., LAGRANHA, C.J., DOI, S.Q., SELLITTI, D.F., PROCOPIO, J., PITHON-CURI, T.C., CORLESS, M. & NEWSHOLME, P. (2005). Molecular mechanisms of glutamine action. *Journal of Cellular Physiology*, **204**, 392-401.
- CURI, R., NEWSHOLME, P., PITHON-CURI, T.C., PIRES DE MELO, M., GARCIA, C., HOMEM DE BITTENCOURT JR, P.I. & GUIMARAES, A.R. (1999). Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, **32**, 15-21.
- CURTHOYS, N.P. & WATFORD M. (1995). Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annual Review of Nutrition*, **15**, 133-159.
- CURTIS, C.F. (1996). Use of a 0.25 per cent fipronil spray to treat sarcoptic mange in a litter of 5 week old puppies. *The Veterinary Record*, **139**, 43-44.
- CUTLER, S.L. (1998). Ectopic *Psoroptes Cuniculi* infestation in a pet rabbit. *Journal of Small Animal Practice*, **39**, 86-87.
- CYNOBER, L.A. (1999). Glutamine metabolism in stressed patients (abstract). *Proceedings of international Congress on amino acids (Germany)*. pp 5.
- D'ANIELLO, A., DI COSMO, A., DI CRISTO, C., ANNUNZIATO, L., PETRUCCELLI, L. & FISHER, G. (1996). Involvement of D-aspartic acid in the synthesis of testosterone in rat testes. *Life Sciences*, **59**, 97-104.

- D'ANIELLO, A., DI FIORE, M. M., FISHER, G.H., MILONE, A., SELENI, A., D'ANIELLO, S., PERNA, A.F. & INGROSSO, D. (2000). Occurrence of D-aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in rat neuroendocrine tissues and their role in the modulation of luteinizing hormone and growth hormone release. *The FASEB Journal*, **14**, 699-714.
- DANBOLT, N.C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, **65**, 1-105.
- DANGE, M. (1994). MB 46513: Exploratory 14-day toxicity study in the rat by gavage. Report No. SA 93063. Rhone-Poulenc Agrochimie Toxicology.
- DARLISON, M.G., PAHAL, I. & THODE, C. (2005). Consequences of the evolution of the GABAA receptor gene family. *Cellular and Molecular Neurobiology*, **25**, 607-624.
- DARMAUN, D., MATTHEWS, D.E. & BIER, D.M. (1986). Glutamine and glutamate kinetics in humans. *The American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, **251**, 117-126.
- DAS, P.C., CAO, Y., CHERRINGTON, N., HODGSON, E. & ROSE, R.L. (2006). Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, **164**, 200-214.
- DAVEY, R.B., AHRENS, E.H., GEORGE, J.E., HUNTER, J.S. & JEANNIN, P. (1998). Therapeutic and persistent efficacy of fipronil against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. *Veterinary Parasitology*, **74**, 261-276.
- DAVIDSON, R. J., JACKSON, D. C., KALIN, N. H. (2000). Emotion, plasticity, contest, and regulation: perspectives from affective neuroscience. *Psychological Bulletin*, **126**, 890-909.
- DAVIES, P.A., HANNA, M.C., HALES, T.G. & KIRKNESS, E.F. (1997). Insensitivity to anaesthetic agents conferred by a class of GABA sub A receptor subunit. *Nature*, **385**, 820-823.
- DAVIS, M. (1994). The role of the amygdala in emotional learning. *International Review of Neurobiology*, **36**, 225 - 266.
- DAVOUST, B., MARIÉ, J.L., MERCIER, S., BONI, M., VANDEWEGHE, A., PARZY, D. & BEUGNET, F. (2003). Assay of fipronil efficacy to prevent canine monocytic ehrlichiosis in endemic areas. *Veterinary Parasitology*, **112**, 91-100.
- DEL OLMO, N., BUSTAMANTE, J., MARTÍN DEL RÍO, R. & SOLÍS, J.M. (2000). Taurine activates GABAA, but not GABAB receptors in rat hippocampal CA1 area. *Brain Research*, **864**, 298-307.

- DENG, Y., PALMER, C.J. & CASIDA, J.E. (1991). House fly brain  $\gamma$ -aminobutyric acid-gated chloride channel: target for multiple classes of insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **41**, 60–65.
- DENG, Y., PALMER, C.J. & CASIDA, J.E. (1993). Housefly head GABA-gated chloride channel: four putative insecticide binding sites differentiated by [ $^3\text{H}$ ]EBOB and [ $^{35}\text{S}$ ]TBPS. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **47**, 98–112.
- DIANTONIO, A., BURGESS, R.W., CHIN, A.C., DEITCHER, D.L., SCHELLER, R.H. & SCHWARZ, T.L. (1993). Identification and characterization of *Drosophila* genes for synaptic vesicle proteins. *The Journal of Neuroscience*, **13**, 4924–4935.
- DINHAM, B. (2000). Poisoning island? Locust control in Madagascar. *Pesticides News*, **48**, 3–6.
- DORMAN, D.C., BRENNEMAN, K.A. & BOLON, B. (2002). Nervous system. In: *Handbook of Toxicologic Pathology*. 2<sup>nd</sup> Edition. Volume 2, Haschek, W.M., Rousseaux, C.G. & Walling, M.A. (Eds.), Academic Press, California, pp. 509–537.
- DOSUNMU, R., WU, J., BASHA, M.R., ZAWIA, N.H. (2007). Environmental and dietary risk factors in Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, **7**, 887–900.
- DOWNS, A.M.R., STAFFORD K.A. & COLES, G.C. (1999). The in vitro activity of imidacloprid and fipronil against permethrin-malathion resistant head lice. *British Journal of Dermatology*, **141** (Suppl. 55), 56.
- DOWNS, A.M.R., STAFFORD, KA. & COLES, G.C. (2000). Susceptibility of British head lice, *Pediculus capitis*, to imidacloprid and fipronil. *Medical and Veterinary Entomology*, **14**, 105–107.
- DREW, L.J., FUSI, S. & HEN, R. (2013). Neurogenesis in the mammalian hippocampus: Why the dentate gyrus? *Learning and Memory*, **20**, 710–29.
- DRYDEN, M.W., DENENBERG, T.M. & BUNCH, S. (2000). Control of fleas on naturally infested dogs and cats and in private residences with topical spot applications of fipronil or imidacloprid. *Veterinary Parasitology*, **93**, 69–75.
- DUKE, R.D., ALLAN, R.D., CHEBIB, M., GREENWOOD, J.R. & JOHNSTON, G.A.R. (1998). Resolution and conformational analysis of diastereoisomeric esters of *cis*- and *trans*-2-(aminomethyl)-1-carboxycyclopropanes. *Tetrahedron Asymmetry*, **9**, 2533–2548.
- DUPUY, J., HUET, A.M., BIRCKEL, P., WEIL, A., ALVINERIE, M. & GALTIER, P. (1997). Major involvement of liver cytochrome P4503A subfamily in fipronil sulfonation. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20** (Suppl. 1), 104–105.

- DURIER, V. & RIVAUT, C. (2000a). Comparisons of toxic baits for controlling the cockroach, *Blattella germanica*: attractiveness and feeding stimulation. *Medical and Veterinary Entomology*, **14**, 410-418.
- DURIER, V. & RIVAUT, C. (2000b). Secondary transmission of toxic baits in German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, **93**, 434-440.
- DUVILANSKI, B.H., SELGAS, L., GARCÍA-BONACHO, M. & ESQUIFINO, A.I. (1998). Daily variations of amino acid concentration in mediobasal hypothalamus, in rats injected with Freud's adjuvant. Effect of cyclosporine. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, **87**, 189-196.
- EBRAHIM, A.S. & SAKTHISEKARAN, D. (1997). Effect of vitamin E and taurine treatment on lipid peroxidation and antioxidant defense in perchloroethylene-induced cytotoxicity in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **8**, 270-274.
- ECHA (European Chemistry Agency) (2017). Fipronil Classification and Labelling Inventory.
- ECHA (European Chemistry Agency) (2015). Opinion proposing harmonised classification and labelling at EU level of Fipronil. 5th June 2015. Committee for Risk Assessment, RAC.
- ECHA (European Chemistry Agency) (2011). Fipronil Assessment Report. Product-type PT18 (insecticides, acaricides and products to control other arthropods). 6th May 2011. Annex I, France.
- EICHER, T., HAUPTMANN, S. & SPEICHER, A. (2004). Pyrazole. In: *The Chemistry of Heterocycles*. Wiley & Sons: New York, (2nd ed.), pp. 179-184.
- EIDEN, A.L., KAUFMAN, P.E., OLF, F.M., ALLAN, S.A. & MILLER, R.J. (2015). Detection of Permethrin Resistance and Fipronil Tolerance in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the United States. *Journal of Medical Entomology*, **52**(3), 429-36.
- EFSA (2013). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance fipronil. *EFSA Journal*, **11**(5), 3158.
- EFSA (2006). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fipronil. *EFSA Scientific Report*, **65**, 1-110.

- EL IDRISSE, A. & TRENNER, E. (1999). Growth factors and taurine protect against excitotoxicity by stabilizing calcium homeostasis and energy metabolism. *The Journal of Neuroscience*, **19**, 9459-9468.
- EL IDRISSE A., SHEN C.H. & L'AMOREAUX W.J. (2013). Neuroprotective role of taurine during aging. *Amino acids*, **45**, 735-750.
- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA (1999). Arthropod Management Tests: 1999, ESA, Lanham.
- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA (2000). Arthropod Management Tests: 2000, ESA, Lanham.
- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA (2001). Arthropod Management Tests: 2001, ESA, Lanham.
- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA (2002). Arthropod Management Tests: 2002, ESA, Lanham.
- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA (2003). Arthropod Management Tests: 2003, ESA, Lanham.
- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA (2004). Arthropod Management Tests: 2004, ESA, Lanham.
- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA (2005). Arthropod Management Tests: 2005, ESA, Lanham.
- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA (2006). Arthropod Management Tests: 2006, ESA, Lanham.
- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA (2007). Arthropod Management Tests: 2007, ESA, Lanham.
- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA (2008). Arthropod Management Tests: 2008, ESA, Lanham.
- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA (2009). Arthropod Management Tests: 2009, ESA, Lanham.
- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA (2010). Arthropod Management Tests: 2010, ESA, Lanham.

- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA (2011). Arthropod Management Tests: 2011, ESA, Lanham.
- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA (2012). Arthropod Management Tests: 2012, ESA, Lanham.
- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA (2013). Arthropod Management Tests: 2013, ESA, Lanham.
- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA (2014). Arthropod Management Tests: 2014, ESA, Lanham.
- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA (2015). Arthropod Management Tests: 2015, ESA, Lanham.
- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA (2016). Arthropod Management Tests: 2016, ESA, Lanham.
- ENZ, R., BRANDSTATTER, J.H., HARTVEIT, E., WASSLE, H. & BORMANN, J. (1995). Expression of GABA receptor  $\rho 1$  and  $\rho 2$  subunits in the retina and brain of the rat. *The European Journal of Neuroscience*, **7**, 1495-1501.
- ENZ, R. & CUTTING, G.R. (1998). Molecular composition of GABA<sub>C</sub> receptors. *Vision Research*, **38**, 1431–1441.
- ENZ, R. & CUTTING, G.R. (1999). GABA<sub>C</sub> receptor  $\rho$  subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties. *European Journal of Neuroscience*, **11**, 41–50.
- ENZEN, G.W., MALDONADO, S.N. & ROJAS, M.G. (2000). Lethal and sublethal effects of selected insecticides and an insect growth regulator on the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) ectoparasitoid *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of Economic Entomology*, **93**, 300-303.
- ERLANDER, M.G., TILLAKARATNE, N.J., FELDBLUM, S., PATEL, N., TOBIN, A.J. (1991). Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron*, **7**, 91–100.
- ESCLAPEZ, M., TILLAKARATNE, N.J., KAUFMAN, D.L., TOBIN, A.J., HOUSER, C.R. (1994). Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *Journal of Neuroscience*, **14**, 1834–1855.

- ESCARTIN, C., VALETTE, J., LEBON, V. & BONVENTO, G. (2006). Neuron–astrocyte interactions in the regulation of brain energy metabolism: A focus on NMR spectroscopy. *Journal of Neurochemistry*, **99**, 393-401.
- ESTER, A., DE VOGEL, R. & BOUMA, E. (1997). Controlling Thrips tabaci (Lind.) in leek by film-coating seeds with insecticides. *Crop Protection*, **16**, 673-677.
- FARRANT, M. (2001). Amino acids: inhibitory. In: *Neurotransmitter, Drugs and Brain Function*, Webster, R.A. (Ed.), John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, pp. 226-250.
- FELTEN, D.L. & SHETTEN, A.N. (2010). Netter. Atlas de Neurociencia (2ª edición). Barcelona: Saunders.
- FFRENCH-CONSTANT, R.H., ANTHONY, N., ARONSTEIN, K., ROCHELEAU, T. & STILWELL, G. (2000). Cyclodiene insecticide resistance: from molecular to population genetics. *Annual Review of Entomology*, **45**, 49-466.
- FFRENCH-CONSTANT, R.H., MORTLOCK, D.P., SHAFFER, C.D., MACINTYRE, R.J. & ROUSH, R.T. (1991). Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance in *Drosophila*: an invertebrate gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 7209-7213.
- FFRENCH-CONSTANT, R.H., STEICHEN, J.C., ROCHELEAU, T.A., ARONSTEIN, K. & ROUSH, R.T. (1993a). A single-amino acid substitution in a  $\gamma$ -aminobutyric acid subtype A receptor locus is associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 1957-1961.
- FFRENCH-CONSTANT, R.H., ROCHELEAU, T.A., STEICHEN, J.C. & CHALMERS, A.E. (1993b). A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature*, **363**, 449-451.
- FFRENCH-CONSTANT, R.H. & ROCHELEAU, T.A. (1993). *Drosophila* gamma-aminobutyric acid receptor gene Rdl shows extensive alternative splicing. *Journal of Neurochemistry*, **60**, 2323-2326.
- FRAME, N.W. & FRAME, R.K.A. (2001). Psoroptes species in alpacas. *The Veterinary Record*, **149**, 128.
- FRANC, M. & CADIERGUES, M.C. (1998). Antifeeding effect of several insecticidal formulations against Ctenocephalides felis on cats. *Parasite*, **5**, 83-86.
- FRANCIS, P.T. (2003). Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, **18**, S15-S21.

- FRATIGLIONI, L., DE RONCHI, D., AGÜERO-TORRES, H. (1999). Worldwide prevalence and incidence of dementia. *Drugs Aging*, **15**, 365-375.
- FREEBORN, D.L., MCDANIEL, K.L., MOSER, V.C. & HERR, D.W. (2015). Use of electroencephalography (EEG) to assess CNS changes produced by pesticides with different modes of action: effects of permethrin, deltamethrin, fipronil, imidacloprid, carbaryl, and triadimefon. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **282**(2), 184-94.
- FREMEAU, R.T. JR, VOGLMAIER, S., SEAL, R.P. & EDWARDS, R.H. (2004) VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends in Neurosciences*, **27**, 98–103.
- FRITSCHY, J.M. & MÖHLER, H. (1995). GABA<sub>A</sub>-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *The Journal of Comparative Neurology*, **359**, 154-194.
- FROSINI, M., SESTI, C., DRAGONI, S., VALOTI, M., PALMI, M., DIXON, H.B.F., MACHETTI, F. & SGARAGLI, G. (2003). Interactions of taurine and structurally related analogues with the GABAergic system and taurine binding sites of rabbit brain. *British Journal of Pharmacology*, **138**, 1163-1171.
- FUCHS, B.C. & BODE, B.P. (2006). Stressing out over survival: glutamine as an apoptotic modulator. *Journal of Surgical Research*, **131**, 26-40.
- FUNG, H.T., CHAN, K.K., CHING, W.M. & KAM, C.W. (2003). A case of accidental ingestion of ant bait containing fipronil. *Clinical Toxicology*, **41**, 245-248.
- GANT, D.B., CHALMERS, A.E., WOLFF, M.A., HOFFMAN, H.B. & BUSHEY, D.F. (1998). Fipronil: action at the GABA receptor. *Critical Reviews in Toxicology*, **2**, 147-156.
- GAO, B., FRITSCHY, J.M., BENKE, D. & MÖHLER, H. (1993). Neuron-specific expression of GABA<sub>A</sub>-receptor subtypes: differential associations of the  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 3-subunits with serotonergic and GABAergic neurons. *Neuroscience*, **54**, 881-892.
- GAO, B., HORNUNG, J.P. & FRITSCHY, J.M. (1995). Identification of distinct GABA<sub>A</sub>-receptor subtypes in cholinergic and parvalbumin-positive neurons of the rat and marmoset medialisepum-diagonal band complex. *Neuroscience*, **65**, 101-117.
- GARATTINI, S. (2000) Glutamic Acid, Twenty years later. *Journal of Nutrition*, **130**, 901S-909S.
- GARZO, E.I., COLLAR, J.L., MUÑIZ, M. & FERERES, A. (2000). Eficacia del fipronil (EXP 60720A) en el control poblacional de *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptero:



- Thripidae) en condiciones de laboratorio. *Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetales*, **15**, 57-64.
- GAUTAM, B.K., HENDERSON, G. & WANG, C. (2014). Localized treatments using commercial dust and liquid formulations of fipronil against *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) in the laboratory. *Insect Science*, **21**(2), 174-80.
- GEORGHIOU, G.P. (1986). The magnitude of the resistance problem. *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*, p. 14–43, National Academy Press, Washington, DC.
- GHASUDDIN, S. & MATSUMURA, F. (1982). Inhibition of gamma-aminobutyric acid (GABA)-induced chloride uptake by gamma-BHC and heptachlor epoxide. *Comparative Biochemistry and Physiology. C: Comparative Pharmacology*, **73**, 141-144.
- GILL, M.W., WAGNER, C.L. & DRISCOLL, C.D. (1993). M&B 46030: single exposure peroral (gavage) neurotoxicity study in Sprague Dawley rats. Report No. 91N0099. Union Carbide Bushy Run Research Center. Estudio confidencial.
- GILL, S.S. & PULIDO, O.M. (2001). Glutamate receptors in peripheral tissues: Current knowledge, future research and implications for toxicology. *Toxicologic Pathology*, **29**(2), 208-223.
- GISSELMANN, G., PLONKA, J., PUSCH, H. & HATT, H. (2004). *Drosophila melanogaster* GRD and LCCH3 subunits form heteromultimeric GABA-gated cation channels. *British Journal of Pharmacology*, **142**, 409–413.
- GLOWINSKI, J. & IVERSEN, L.L. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain – I. The disposition of [3H] norepinephrine, [3H] dopamine and [3H] DOPA in various regions of the brain. *Journal of Neurochemistry*, **13**, 655-669.
- GODINHO, A.F., DE OLIVEIRA SOUZA, A.C., CARVALHO, C.C., HORTA, D.F., DE FRAIA, D., ANSELMO, F., CHAGURI, J.L. & FARIA, C.A. (2016). Memory impairment due to fipronil pesticide exposure occurs at the GABA<sub>A</sub> receptor level, in rats. *Physiology & Behavior*, **165**, 28–34.
- GORNE-TSCHELNOKOW, U., STRECKER, A., KADUK, C., NAUMANN, D. & HUCHO, F. (1994). The transmembrane domains of the nicotinic acetylcholine receptor contain alpha-helical and beta structures. *The EMBO Journal*, **13**, 338–341.
- GRAS, C., HERZOG, E., BELLENCHI, G.C., BERNARD, V., RAVASSARD, P., POHL, M., GASNIER, B., GIROS, B. & EL MESTIKAWY, S. (2002). A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *Journal of Neurochemistry*, **22**, 5442-5451.

- GREEN, T. R., FELLMAN, J. H., EICHER, A. L. & PRATT, K. L. (1991). Antioxidant role and subcellular location of hypotaurine and taurine in human neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1073**, 91-97.
- GROLLEAU, F. & SATELLE, D.B. (2000). Single channel analysis of the blocking actions of BIDN and fipronil on a *Drosophila melanogaster* GABA receptor (RDL) stably expressed in a *Drosophila* cell line. *British Journal of Pharmacology*, **130**, 1833-1842.
- GUERRIERO, R.M., GIZA, C.C. & ROTENBERG, A. (2015). Glutamate and GABA imbalance following traumatic brain injury. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, **15(5)**, 27.
- GUPTA, R.C., WIN, T., BITTNER, S. (2005). Taurine analogues; a new class of therapeutics: retrospect and prospects. *Current Medicinal Chemistry*, **12**, 2021-39.
- GUTIERREZ, A., KHAN, Z.U. & DE BLAS, A.L. (1994). Immunocytochemical localization of gamma 2 short and gamma 2 long subunits of the GABAA receptor in the rat brain. *The Journal of Neuroscience*, **14**, 7168-7179.
- HAINZL, D. & CASIDA, J.E. (1996). Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 12764-12767.
- HAINZL, D., COLE, L.M. & CASIDA, J.E. (1998). Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chemical Research in Toxicology*, **11**, 1529-1535.
- HANLEY, J.G., KOULEN, P., BEDFORD, F., GORDON-WEEKS, P.R. & MOSS, S.J. (1999). The protein MAP-1B links GABA<sub>A</sub> receptors to the cytoskeleton at retinal synapses. *Nature*, **397**, 66-69.
- HARRISON, J.B., CHEN, H.H., SATTELLE, E., BARKER, P.J., HUSKISSON, N.S., RAUH, J.J., BAI, D. & SATTELLE, D.B. (1996). Immunocytochemical mapping of a C-terminus anti-peptide antibody to the GABA receptor subunit, RDL in the nervous system in *Drosophila melanogaster*. *Cell and Tissue Research*, **284**, 269-278.
- HARVEY, R.G., PENALIGGON, E.J. & GAUTIER, P. (1997). Prospective study comparing fipronil with dichlorvos/fenitrothion and methoprene/pyrethrins in control of flea bite hypersensitivity in cats. *The Veterinary Record*, **141**, 628-629.
- HENDERSON, A.S. (1988). The risk factors for Alzheimer's disease: A review and a hypothesis. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, **78**, 257-275.

- HERTZ, L. (2006). Glutamate, a neurotransmitter— And so much more A synopsis of Wierzba III. *Neurochemistry International*, **48**, 416-425.
- HEVERS, W. & LUDDENS, H. (1998). The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Molecular Neurobiology*, **18**, 35–86.
- HODGSON, E. & LEVI, P.E. (2001). Metabolism in pesticides. In: Handbook of Pesticide Toxicology. Vol. 1: Principles, Krieger, R., Doull, J., Ecobichon, D., Gammon, D., Hodgson, E., Reiter, L. & Ross, J. (Eds.), Academic Press, San Diego, pp. 531-562.
- HOLBROOK, G.L., ROEBUCK, J., MOORE, C.B., WALDOVOGEL, M.G. & SCHAL, C. (2003). Origin and extent of resistance to fipronil in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, **96**, 1548-1558.
- HOLLERMAN, J. R., TREMBLAY, L. & SCHULTZ, W. (2000). Involvement of basal ganglia and orbitofrontal cortex in goal-directed behavior. *Progress in Brain Research*, **126**, 193–215.
- HOLMES, R. P., GOODMAN, H. O., SHIHABI, Z. K. & JAROW, J. P. (1992). The taurine and hypotaurine content of human semen. *Journal of Andrology*, **13**, 289-292.
- HOOPER-BUI, L.M. & RUST, M.K. (2000). Oral toxicity of abamectin, boric acid, fipronil, and hydramethylnon to laboratory colonies of Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology*, **93**, 858-864.
- HORIG, H., SPAGNOLI, G.C., FILGUEIRA, L., BABST, R., GALLATI, H., HARDER, F., JURETIC, A. & HEBERER, M. (1993). Exogenous glutamine requirement is confined to late events of T cell activation. *Journal of Cellular Biochemistry*, **53**, 343-351.
- HOROSZOK, L., RAYMOND, V., SATTELLE, D.B. & WOLSTENHOLME, A.J. (2001). GLC-3: a novel fipronil and BIDN-sensitive, but picrotoxinin-insensitive, L-glutamate-gated chloride channel subunit from *Caenorhabditis elegans*. *British Journal of Pharmacology*, **132**, 1247– 1254.
- HOSIE, A., BAYLIS, H., BUCKINGHAM, S. & SATTELLE, D. (1995). Actions of the insecticide fipronil on dieldrin-sensitive and resistant GABA receptors of *Drosophila melanogaster*. *British Journal of Pharmacology*, **115**, 909-912.
- HOSIE, A.M., ARONSTEIN, K., SATTELLE, D.B. & FFRENCH-CONSTANT, R.H. (1997). Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends in Neurosciences*, **20**, 578–583.

- HOSIE, A.M. & SATTELLE, D.B. (1996a). Agonist pharmacology of two *Drosophila* GABA receptor splice variants. *British Journal of Pharmacology*, **119**, 1577–1585.
- HOSIE, A.M. & SATTELLE, D.B. (1996b). Allosteric modulation of an expressed homooligomeric GABA-gated chloride channel of *Drosophila melanogaster*. *British Journal of Pharmacology*, **117**, 1229–1237.
- HUGHES, E.W. (1997). Fipronil: Neurotoxicity to rats by acute oral administration (including a time to peak effect study). Report No. 536/973345. Huntingdon Life Sciences Ltd. Estudio confidencial.
- HUTCHINSON, M.J., JACOBS, D.E., FOX, M.T., JEANNIN, P. & POSTAL, J.M. (1998). Evaluation of flea control strategies using fipronil on cats in a controlled simulated home environment. *The Veterinary Record*, **142**, 356-357.
- IBRAHIM, S.A., HENDERSON, G. & FEI, H. (2003). Toxicity, repellency, and horizontal transmission of fipronil in the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology*, **96**, 461-467.
- IKEDA, T., ZHAO, X., NAGATA, K., KONO, Y., SHONO, T., YEH, J.Z. & NARAHASHI, T. (2001). Fipronil modulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **296**, 914-921.
- IKEDA, T., ZHAO, X., KONO, Y., YEH, J.Z. & NARAHASHI, T. (2003). Fipronil modulation of glutamate-induced chloride currents in cockroach thoracic ganglion neurons. *Neurotoxicology*, **24**, 807–815.
- IKEDA, T., NAGATA, K., KONO, Y., YEH, J.Z. & NARAHASHI, T. (2004). Fipronil modulation of GABA<sub>A</sub> receptor single-channel currents. *Pesticide Management Science*, **60**, 487-492.
- INFOAGRO (2004). París prohíbe comercializar productos con fipronil. Disponible en: <http://www.infoagro.com/noticias/2004/02/20040224.asp>
- INTERNATIONAL UNION ON PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). COMMISSION OF TOXICOLOGY. (1993). Glossary for chemists of terms used in toxicology. *Pure and Applied Chemistry*, **65**, 2003-2122.
- ITO, T., SCHAFFER, S.W. & AZUMA, J. (2012). The potential usefulness of taurine on diabetes mellitus and its complications. *Amino Acids*, **42**, 1529-39.
- JACOBS, D.E., HUTCHINSON, M.J. & RYAN, W.G. (2001). Control of the flea populations in a simulated home environment model using lufenuron, imidacloprid or fipronil. *Medical and Veterinary Entomology*, **25**, 73-77.

- JENNINGS, K.A., KELLER, R.J. & DOSS, R.B. (2002). Human exposure to fipronil from dogs treated with Frontline. *Veterinary and Human Toxicology*, **44**, 301-303.
- JOHNSTON, G.A. (1996a). GABA<sub>A</sub> receptor pharmacology. *Pharmacology and Therapeutics*, **69**, 173-198.
- JOHNSTON, G.A. (1996b). GABA<sub>C</sub> receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends in Pharmacological Sciences*, **17**, 319–323.
- JOHNSTON, G.A.R. (2001). Molecular biology, pharmacology, and physiology of GABA<sub>C</sub> receptors, In: *The GABA Receptors*. 2<sup>nd</sup> Edition, Enna, S.J. & Bowery, N.G. (Eds.), Humana Press, New Jersey, pp. 297-323.
- JOHNSTON, G.A., CURTIS, D.R., BEART, P.M., GAME, C.J., MCCULLOCH, R.M., & TWITCHIN, B. (1975). *Cis*- and *trans*-4-aminocrotonic acid as GABA analogues of restricted conformation. *Journal of Neurochemistry*, **24**, 157–160.
- JOINT MEETING OF THE FAO PANEL OF EXPERTS ON PESTICIDE RESIDUES IN FOOD AND THE ENVIRONMENT AND THE WHO CORE ASSESSMENT GROUP ON PESTICIDE RESIDUES (JMPR) (1998). *Pesticide Residues in Food – 1997. Evaluations Part II: Toxicological and Environmental*. Lyon (France), 22 September - 1 October 1997.
- JOINT MEETING OF THE FAO PANEL OF EXPERTS ON PESTICIDE RESIDUES IN FOOD AND THE ENVIRONMENT AND THE WHO CORE ASSESSMENT GROUP ON PESTICIDE RESIDUES (JMPR) (2002). *Pesticide Residues in Food – 2001. Part I: Residues*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, pp. 191-365.
- JONKERS, N., SARRE, S., EBINGER, G., MICHOTTE, Y. (2002). MK801 suppresses the L-DOPA-induced increase of glutamate in striatum of hemi-Parkinson rats. *Brain Research*, **926**, 149-155.
- JUKES, A.A., COLLIER, R.H. & FINCH, S. (2001). Cabbage root fly control using non-organophosphorus insecticides. Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. *Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen*, **66**, 395-402.
- JULIO-PIEPER, M., FLOR, P.J., DINAN, T.G. & CRYAN, J.F. (2011). Exciting Times beyond the Brain: Metabotropic Glutamate Receptors in Peripheral and Non-Neural Tissues. *Pharmacological Reviews*, **63** (1), 35-58.
- KAAKEH, W., REID, B.L. & BENNET, G.W. (1997). Toxicity of fipronil to German and American cockroaches. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **84**, 229-237.

- KAMIJIMA, M. & CASIDA, J.E. (2000). Regional modification of [<sup>3</sup>H]ethynylbicycloorthobenzoate binding in mouse brain GABA<sub>A</sub> receptor by endosulfan, fipronil and avermectin B<sub>1a</sub>. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **163**, 188-194.
- KANG, N., XU, J., XU, Q., NEDERGAARD, M. & KANG, J. (2005). Astrocytic glutamate release-induced transient depolarization and epileptiform discharges in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology*, **94**, 4121-4131.
- KAUFMAN, D.L., HOUSER, C.R., TOBIN, A.J. (1991). Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *Journal of Neurochemistry*, **56**, 720-723.
- KEMP, J.A. & MCKERNAN, R.M. (2002). NMDA receptor pathways as drug targets. *Nature Neuroscience*, **5**, 1039-1042.
- KEY, P.B., CHUNG, K.W., OPATKIEWICZ, A.D., WIRTH, E.R. & FULTON, M.H. (2003). Toxicity of the insecticides fipronil and endosulfan to selected life stages of the grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **70**, 533-540.
- KHADRAWY, Y.A., MOURAD, I.M., MOHAMMED, H.S., NOOR, N.A. & ABOUL EZZ, H.S. (2017). Cerebellar neurochemical and histopathological changes in rat model of Parkinson's disease induced by intrastriatal injection of rotenone. *General Physiology and Biophysics*, 36(1), 99-108.
- KHOGALI, S.E., PRINGLE, S.D., WERYK, B.V. & RENNIE, M.J. (2002). Is glutamine beneficial in ischemic heart disease? *Nutrition*, **18**, 123-126.
- KIM, H.Y., KIM, H.V., YOON, J.H., KANG, B.R., CHO, S.M., LEE, S., KIM, J.Y., KIM, J.W., CHO, Y., WOO, J. & KIM, Y. (2014). Taurine in drinking water recovers learning and memory in the adult APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, **4**, 7467.
- KING, V.C. (1990). M&B 46030: teratology study in the rabbit. Report No. 90/RHA 321/0722. Life Science Research Ltd. Estudio confidencial.
- KING, V.C. (1992). M&B 46030: reproductive performance study in rats treated continuously through two successive generations. Report No. 92/RHA425/0309. Life Science Research Ltd. Estudio confidencial..
- KOWALCHUK, J.M., CURI, R. & NEWSHOLME, E.A. (1988). Glutamine metabolism in isolated incubated adipocytes of the rat. *Biochemical Journal*, **249**, 705-708.

- KOLACZINSKI, J. & CURTIS, C. (2001). Laboratory evaluation of fipronil, a phenylpyrazole insecticide, against adult *Anopheles* (Diptera: Culicidae) and investigation of its possible cross-resistance with dieldrin in *Anopheles stephensi*. *Pest Management Science*, **57**, 41-45.
- KORPI, E.R. (1994). Role of GABA<sub>A</sub> receptors in the actions of alcohol and alcoholism: recent advances. *Alcohol and Alcoholism*, **29**, 115-129.
- KORPI, E.R., GRUNDER, G. & LUDDENS, H. (2002). Drug interactions at GABA<sub>A</sub> receptors. *Progress in Neurobiology*, **67**, 113-159.
- KROGSGAARD-LARSEN, P., FRØLUND, B., JORGENSEN, F.S. & SCHOUSBOE, A. (1994). GABA<sub>A</sub> receptor agonists, partial agonists and antagonists. Design and therapeutic prospects. *Journal of Medical Chemistry*, **37**, 2489-2505.
- KROGSGAARD-LARSEN, P., FRØLUND, B., KRISTIANSEN, U. & EBERT, B. (2002). Ligands for the GABA<sub>A</sub> receptor complex. In: *Glutamate and GABA Receptors and Transporters: Structure, Function and Pharmacology*, Egebjerg, J., Schousboe, A. & Krogsgaard-Larsen, P. (Eds.), Taylor & Francis, London, pp. 236-274.
- KUSAMA, T., SPIVAK, C.E., WHITING, P., DAWSON, V.L., SCHAEFFER, J.C. & UHL, G.R. (1993). Pharmacology of GABA  $\rho 1$  and  $\alpha/\beta$  receptors expressed in *Xenopus* oocytes and COS cells. *British Journal of Pharmacology*, **109**, 200-206.
- L' AMOREAUX, W.J., CUTTITTA, C., SANTORA, A., BLAIZE, J.F., TACHJADI, J. & EL IDRISSI, A. (2010). Taurine regulates insulin release from pancreatic beta cell lines. *Journal of Biomedical Science*, **17**, Suppl 1S11.
- LAAKE, J.H., TAKUMI, Y., EIDET, J., TORGNER, I.A., ROBERG, B., KVAMME, E. & OTTERSEN, O.P. (1999) Postembedding immunogold labelling reveals subcellular localization and pathway-specific enrichment of phosphate activated glutaminase in rat cerebellum. *Neuroscience*, **88**, 1137-1151.
- LAFUENTE, A., MÁRQUEZ, N., PAZO, D. & ESQUIFINO, A.I. (2001). Cadmium effects on dopamine turnover and plasma levels of prolactin, GH and ACTH. *Biometals*, **13**, 47-55.
- LAMBARDINI, J.B. (1985). Effects of taurine on calcium ion uptake and protein phosphorylation in rat retinal membrane preparations, *Journal of Neurochemistry*, **45**, 268-275.
- LANCTÔT, K.L., RAJARAM, R.D. & HERRMANN, N. (2009). Therapy for Alzheimer's Disease: How Effective are Current Treatments? *Therapeutic advances in neurological disorders*, **2(3)**, 163-180.

- LAURIE, D.J., WISDEN, W. & SEEBURG, P.H. (1992). The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *The Journal of Neuroscience*, **12**, 4151–4172.
- LE GOFF, G., HAMON, A., BERGE, J.B. & AMICHOT, M. (2005). Resistance to fipronil in *Drosophila simulans*: influence of two point mutations in the RDL GABA receptor subunit. *Journal of Neurochemistry*, **92**, 1295–1305.
- LIMA, L. & CUBILLOS, S. (1998). Taurine might be acting as a trophic factor in the retina by modulating phosphorylation of cellular proteins, *Journal of Neuroscience Research*, **53**, 377–384.
- LIU, W., GE, T., LENG, Y., PAN, Z., FAN, J., YANG, W. & CUI, R. (2017). The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. *Neural Plasticity*, pendiente de publicar.
- LÓPEZ-POUSA, S., VILALTA FRANCH, J., LLINÀS REGLÀ, J. (2002). Manual de Demencias, 2ª Edición. Prous Science, Barcelona.
- LUDDENS, H., PRITCHETT, D.B., KOHLER, M., KILLISCH, I., KEINANEN, K., MONYER, H., SPRENGEL, R., & SEEBURG, P.H. (1990). Cerebellar GABAA receptor selective for a behavioural alcohol antagonist. *Nature*, **346**, 648–651.
- MAAR, T., MORAN, J., SCHOUSBOE, A. & PASANTES-MORALES, H. (1995). Taurine deficiency in dissociated mouse cerebellar cultures affects neuronal migration. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **13**, 491–502.
- MACDONALD, R.L. & OLSEN, R.W. (1994). GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Annual Review of Neuroscience*, **17**, 569–602.
- MACIEJAK, P., SZYNDLER, J., TURZYŃSKA, D., SOBOLEWSKA, A., TARACHA, E., SKÓRZEWSKA, A., LEHNER, M., BIDZIŃSKI, A., HAMED, A., WISŁOWSKA-STANEK, A. & PLAŹNIK, A. (2009). The effects of group III mGluR ligands on pentylenetetrazole-induced kindling of seizures and hippocampal amino acid concentration. *Brain Research*, **1282**, 20–27.
- MACKENZIE, B. & ERICKSON, J.D. (2004). Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Archiv*, **447**, 784–795.
- MALAISSE, W.J., SENER, A., CARPINELLI, A.R., ANJANEYULU, K., LEBRUN, P., HERCHUELZ, A. & CHRISTOPHE, J. (1980). The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XLVI. Physiological role of L-glutamine as a fuel for pancreatic islets. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **20**, 171–189.



- MALMINEN, O. & KONTRO, P. (1986). Modulation of the GABA<sub>A</sub> benzodiazepine receptor complex by taurine in rat brain membranes. *Neurochemical Research*, **11**, 85-94.
- MASSOL, R.H. & ANTOLLINI, S.S. (2000). Effect of organochlorine insecticides on nicotinic acetylcholine receptor-rich membranes. *Neuropharmacology*, **39**, 1095-1106.
- MATES, J.M., PEREZ-GOMEZ, C., NUÑEZ DE CASTRO, I., ASENJO, M. & MARQUEZ, J. (2002). Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **34**, 439-458.
- MATSUDA, K., BUCKINGHAM, S.D., KLEIER, D., RAUH, J.J., GRAUSO, M. & SATTELLE, D.B. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, **22** (11), 573-580.
- MCKERNAN, R.M. & WHITING, P.J. (1996). Which GABA<sub>A</sub>-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends in Neurosciences*, **19**, 139-143.
- MEDLAU, L., HNILICA, K.A., LOWER, K., ALVA, R., CLEKIS, T., CASE, J., MCARTHUR, T.R., BARRICK, R.A., JEANNIN, P. & IRWIN, J. (2002). Effect of topical application of fipronil in cats with flea allergic dermatitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **221**, 254-257.
- MEDLAU, L., CLEKIS, T., MCARTHUR, T.R., ALVA, R., BARRICK, R.A., JEANNIN, P. & IRWIN, J. (2003). Evaluation of fipronil spot-on in the treatment of flea allergic dermatitis in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, **44**, 71-75.
- MEELEY, M.P., UNDERWOOD, M.D., TALMAN, W.T. & REIS, D.J. (1989). Content and in vitro release of endogenous amino acids in the area of the nucleus of the solitary tract of the rat. *Journal of Neurochemistry*, **53**, 1807-1817.
- MEHLHORN, H., HANSEN, O. & MENCKE, N. (2001). Comparative study on the effects of three insecticides (fipronil, imidacloprid, selamectin) on developmental stages of the cat flea (*Ctenocephalides felis* Bouché 1835): a light and electron microscopic analysis of in vivo and in vitro experiments. *Parasitology Research*, **87**, 198-207.
- MELDRUM, B.S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *Journal of Nutrition*, **130**, 1007S-1015S.
- MELIS, G.C., TER WENGEL, N., BOELEN, P.G. & VAN LEEUWEN, P.A. (2004). Glutamine recent developments in research on the clinical significance of glutamine. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, **7**, 59-70.
- METZGER, M.E. & RUST, M.K. (2002). Laboratory evaluation of fipronil and imidacloprid topical insecticides for control of the plague vector *Oropsylla montana* (Siphonaptera:

- Ceratophyllidae) on California ground squirrels. *Journal of Medical Entomology*, **39**, 152-161.
- MICHAELIS, E.K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobiology*, **54**, 369-415.
- MILLAN, M.J. (2002). Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, **66** (6), 355–474.
- MILLAR, N.S., BUCKINGHAM, S.D. & SATTELLE, D.B. (1994). Stable expression of functional homo-oligomeric *Drosophila* GABA receptor in a *Drosophila* cell line. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, **258**, 307-314.
- MOFFAT, A.S. (1993). New chemicals seek to outwit insect pest. *Science*, **261**, 550-551.
- MOHAMED, F., SENARATHNA, L., PERCY, A., ABEYEWARDENE, M., EAGLESHAM, G., CHENG, R., AZHER, S., HITTARAGE, A., DISSANAYAKE, W., REZVI-SHERIFF, M.H., DAVIES, W., BUCKLEY, N.A. & EDDLESTON, M. (2004). Acute human self-poisoning with the N-phenylpyrazole insecticide fipronil – a GABAA-gated chloride channel blocker. *Clinical Toxicology*, **47**, 955-963.
- MOLCHANOVA, S.M., OJA, S.S., SARANSAARI, P. (2007). Effect of taurine on the concentrations of glutamate, GABA, glutamine and alanine in the rat striatum and hippocampus. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, **50**, 95-97.
- MONTANHA, F.P., MACHADO, F.D., FARIA, C.A., ANSELMO, F., ESTANGARILLOT, R.F., FERIOLI, R.B., ROCHA, N.S. & GODINHO, A.F. (2016). Lactational Exposure to Fipronil Pesticide in Low Dose Impairs Memory in Rat Offspring. *Journal of Neurological Disorders*, **4**, 279.
- MORAN, J., SALAZAR, P. & PASANTES-MORALES, H. (1987). Effect of tocopherol and taurine on membrane fluidity of retinal rod outer segments. *Experimental Eye Research*, **45**, 769-776.
- MORGAN, M.M., CLAYTON, C.C. & LANE, D.A. (2003). Behavioral evidence linking opioid-sensitive GABAergic neurons in the ventrolateral periaqueductal gray to morphine tolerance. *Neuroscience*, **118**, 227–232.
- MORTON, S.M. & BASTIAN, A.J. (2004) Cerebellar control of balance and locomotion. *Neuroscientist*, **10**(3), 247-59.
- MOSTERT, M.A., SCHOEMAN, A.S. & VAN DER MERWE, M. (2002). The relative toxicities of insecticides to earthworms of the Pheretima group (Oligochaeta). *Pest Management Science*, **58**, 446-450.

- MULROONEY, J.E., WOLFENBARGER, D.A., HOWARD, K.D. & GOLI, D. (1998). Efficacy of ultra low volume and high volume applications of fipronil against the boll weevil. *Journal of Cotton Science*, **2**, 110-116.
- MULROONEY, J.E. & GOLI, D. (1999). Efficacy and degradation of fipronil applied to cotton for control of *Anthonomus grandis grandis* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, **92**, 1364-1368.
- MURATA, Y., WOODWARD, R.M., MILEDI, R. & OVERMAN, L.E. (1996). The first selective antagonist for a GABA<sub>C</sub> receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **6**, 2071-2076.
- MURRAY, E., WISE, S. & RHODES, S. (2011). What can different brains do with reward? *Neurobiology of Sensation and Reward*, ed J. Gottfried (Boca Raton, FL: CRC Press), 61–98.
- NARAHASHI, T., ZHAO, X., IKEDA, T., SALGADO, V. & YEH, J.Z. (2010). Glutamate-activated chloride channels: Unique fipronil targets present in insects but not in mammals. *Pesticide Biochemistry Physiology*, **97**(2), 149–152.
- NARAHASHI, T., ZHAO, X., IKEDA, T., NAGATA, K. & YEH, J.Z. (2007). Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Human & Experimental Toxicology*, **26**, 361-366.
- NEAL, R., COOPER, K., KELLOGG, G., GWER, H. & ERCAL, N. (1999). Effect of some sulfur containing antioxidants on lead exposed lenses. *Free Radical Biology & Medicine*, **26**, 239-243.
- NEWSHOLME, P., CURI, R., GORDON, S. & NEWSHOLME, E.A. (1986). Metabolism of glucose, glutamine, longchain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. *Biochemical Journal*, **239**, 121-125.
- NEWSHOLME, P., LIMA, M.M., PROCOPIO, J., PITHON-CURI, T.C., DOI, S.Q., BAZOTTE, R.B. & CURI, R. (2003a). Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, **36**, 153-163.
- NEWSHOLME, P., PROCOPIO, J., LIMA, M.M., PITHON-CURI, T.C. & CURI, R. (2003b). Glutamine and glutamate—their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochemistry and Function*, **21**, 1-9.
- NGIM, K.K., MABURY, S.A. & CROSBY, D.G. (2000). Elucidation of fipronil photodegradation pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 4661-4665.
- NUTTALL, T.J., FRENCH, A.T., CHEETHAM, H.C. & PROCTOR, F.J. (1998). Treatment of *Trombicula autumnalis* infestation in dogs and cats with a 0.25 per cent fipronil pump spray. *Journal of Small Animal Practice*, **39**, 237-239.

- O' DWYER, S. T., SCOTT, T., & SMITH, R. J. (1987). 5-Fluorouracil toxicity on small intestine mucosa but not while blood cells is decreased by glutamine. *Clinical Research in Cardiology*, **387a**, 10-16.
- OHI, M., DALSENTER, P.R., ANDRADE, A.J.M. & NASCIMENTO, A.J. (2004). Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. *Toxicology Letters*, **146**, 121-127.
- OJA, S.S., KORPI, E.R., SARANSAARI, P. (1990). Modification of chloride flux across brain membranes by inhibitory amino acids in developing and adult mice. *Neurochemical Research*, **15**, 797-804.
- OKAMOTO, K., KIMURA, H. & SAKAI, Y. (1983). Taurine-induced increase of the Cl<sup>-</sup>-conductance of cerebellar Purkinje cell dendrites in vitro. *Brain Research*, **259**, 319-323.
- OENARTO, J., GÖRG, B., MOOS, M., BIDMON, H.J. & HÄUSSINGER, D. (2014). Expression of organic osmolyte transporters in cultured rat astrocytes and rat and human cerebral cortex. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **560**, 59–72.
- OGURUSO, T., YANAGI, K., WATANABE, M., FUKAYA, M. & SHINGAI, R. (1999). Localisation of GABA receptor  $\rho 2$  and  $\rho 3$  subunits in rat brain and functional expression homo-oligomeric  $\rho 3$  receptors and hetero-oligomeric  $\rho 2\rho 3$  receptors. *Receptors Channels*, **6**, 463-476.
- OZOE, Y. & AKAMATSU, M. (2001). Non-competitive GABA antagonists: probing the mechanisms of their selectivity for insect versus mammalian receptors. *Pest Management Science*, **57**, 923-931.
- PALACÍN, M., ESTÉVEZ, R., BERTRAN, J. & ZORZANO, A. (1998). Molecular Biology of Mammalian Plasma Membrane Amino Acid Transporters. *Physiological Reviews*, **78**, 969-1054.
- PALKOVITS, M., ELEKES, I., LANG, T. & PATTHY, A. (1986). Taurine levels in discrete brain nuclei of rats. *Journal of Neurochemistry*, **47**, 1333-1335.
- PANTELEEV, J., MAGUIRE, R.J. & KUNG, D.W. (2015). Alkylation of Nitrogen-Containing Heterocycles via In Situ Sulfonyl Transfer. *Synlett*, **26**, A–G.
- PARK, J.H., PARK, Y.S. & KOH, H.C. (2016). Progressive loss of nigrostriatal dopaminergic neurons induced by inflammatory responses to fipronil. *Toxicology Letters*, **258**, 36-45
- PARRÓN, T., REQUENA, M., HERNÁNDEZ, A.F., ALARCÓN, R. (2011). Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **256**, 379-385.

- PAULA-LIMA, A.C., DE FELICE, F.G., BRITO-MOREIRA, J. & FERREIRA, S.T. (2005). Activation of GABA<sub>A</sub> receptors by taurine and muscimol blocks the neurotoxicity of beta-amyloid in rat hippocampal and cortical neurons. *Neuropharmacology*, **49**(8), 1140-8.
- PAULA-LIMA, A.C., BRITO-MOREIRA, J. & FERREIRA, S.T. (2013). Deregulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, **126**, 191-202.
- PAYNE, P.A., DRYDEN, M.W., SMITH V. & RIDLEY, R.K. (2001). Effect of 0.29% w/w fipronil spray on adult flea mortality and egg production of three different cat flea, *Ctenocephalides felis* (Bouché), strains infesting cats. *Veterinary Parasitology*, **102**, 331-340.
- PECCI, L., MONTEFOSCHI, G., FONTANA, M., DUPRÈ, S., COSTA, M., CAVALLINI, D. (2000). Hypotaurine and superoxide dismutase: Protection of enzyme against inactivation by hydrogen peroxide and peroxidation to taurine. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **483**, 163-168.
- PERSOHN, E., MALHERBE, P. & RICHARDS, J.G. (1991). *In situ* hybridization histochemistry reveals a diversity of GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs in neurons of the rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Neuroscience*, **42**, 497-507.
- PETRONINI, P.G., URBANI, S., ALFIERI, R., BORGHETTI, A.F. & GUIDOTTI, G.G. (1996). Cell susceptibility to apoptosis by glutamine deprivation and rescue Survival and apoptotic death in cultured lymphoma-leukemia cell lines. *Journal of Cellular Physiology*, **169**, 175-185.
- PEVELING, R., MCWILLIAM, A.N., NAGEL, P., RASOLOMANANA, H., RAHOLJAONA, H., RAKOTOMIANINA, L., RAVONINJATOVO, A., DEWHURST, C.F., GIBSON, G., RAFANOMEZANA, S. & TINGLE, C.C.D. (2003). Impact of locust control on harvester termites and endemic vertebrate predators in Madagascar. *Journal of Applied Ecology*, **40**, 729-741.
- PION, P.D., KITTLESON, M.D., ROGERS, Q.R. & MORRIS, J.G. (1987). Myocardial failure in cats associated with low plasma taurine: a reversible cardiomyopathy. *Science*, **237**, 764-768.
- PITHON-CURI, T.C., SCHUMACHER, R.I., FREITAS, J.J., LAGRANHA, C., NEWSHOLME, P., PALANCH, A.C., DOI, S.Q. & CURI, R. (2003). Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. *American Journal of Physiology*, **284**, 1355-1361.
- POLLMEIER, M., PENGGO, G., JEANNIN, P. & SOLL, M. (2002). Evaluation of the efficacy of fipronil formulations in the treatment and control of biting lice, *Trichodectes canis* (De Geer, 1778) on dogs. *Veterinary Parasitology*, **107**, 127-136.

- POLLMEIER, M., PENG, G., LONGO, M. & JEANNIN, P. (2004). Effective treatment and control of biting lice *Felicola subrostratus* (Nitzsch in Burmeister, 1838), on cats using fipronil formulations. *Veterinary Parasitology*, **121**, 157-165.
- POULTER, M.O. & BROWN, L.A. (1999). Transient expression of GABAA receptor subunit mRNAs in the cellular processes of cultured cortical neurons and glia. *Brain Research*, **69**, 44-52.
- POWLES, P. (1992). (14C)-M&B 46,030: absorption, distribution, metabolism and excretion in the rat. Report No. 7040-68/117. Hazleton UK. Estudio confidencial..
- PRENTICE, H., MODI, J.P. & WU, J.Y. (2015). Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2015**, 964518.
- QIAN, H., DOWLING, J.E., & RIPPS, H. (1999). A single amino acid in the second transmembrane domain of GABA rho subunits is a determinant of the response kinetics of GABAC receptors. *Journal of Neurobiology*, **40**, 67-76.
- QUIRK, K., GILLARD, N.P., RAGAN, I., WHITING, P.J. & MCKERNAN, R.M. (1994). Model of subunit composition of  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptor subtypes expressed in rat cerebellum with respect to their  $\alpha$  and  $\beta/\delta$  subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**, 16020-16028.
- QUIRK, K., BLURTON, P., FLETCHER, S., LEESON, P., TANG, F., MELLILO, D., RAGAN, C.I., & MCKERNAN, R.M. (1996). [ $^3\text{H}$ ] L-655,708: a novel ligand selective for the benzodiazepine site of GABA<sub>A</sub> receptors which contain the alpha 5 subunit. *Neuropharmacology*, **35**, 1331-1335.
- RAGOZZINO, D., WOODWARD, R.M., MURATA, F., EUSEBI, F., OVERMAN, L.E. & MILEDI, R. (1996). Design and *in vitro* pharmacology for a selective  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor antagonist. *Molecular Pharmacology*, **50**, 1024-1030.
- RAJONHSON, D.M., MIARINJARA, A., RAHELINIRINA, S., RAJERISON, M. & BOYER, S. (2017). Effectiveness of Fipronil as a Systemic Control Agent Against *Xenopsylla cheopis* (Siphonaptera: Pulicidae) in Madagascar. *Journal of Medical Entomology*, pendiente de publicar.
- RAMOS LIMA, M.M., DE MELLO, M.A. & CURI, R. (2002). Walker 256 tumour growth causes marked changes of glutamine metabolism in rat small intestine. *Cell Biochemistry and Function*, **20**, 107-113.
- RATRA, G.S. & CASIDA, J.E. (2001). GABA receptor subunit composition relative to insecticide potency and selectivity. *Toxicology Letters*, **122**, 215-222.

- RATRA, G.S., KAMITA, S.G. & CASIDA, J.E. (2001). Role of human GABA<sub>A</sub> receptor  $\beta$ 3 subunit in insecticide toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **172**, 233-240.
- RATRA, G.S., ERKKILA, B.E., WEISS, D.S. & CASIDA, J.E. (2002). Unique insecticide specificity of human homomeric  $\rho$ 1 GABA<sub>C</sub> receptor. *Toxicology Letters*, **129**, 47-53.
- RAUH, J.J., LUMIS, S.C. & SATELLE, D.B. (1990). Pharmacological and biochemical properties of insect GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, **11**(8), 325-9.
- RAUH, J.J., BENNER, E., SCHNEE, M.E., CORDOVA, D., HOLYOKE, C.W., HOWARD, M.H., BAI, D., BUCKINGHAM, S.D., HUTTON, M.L. & HAMON, A. (1997). Effects of [3H]BIDN, a novel bicyclic dinitrile radioligand for GABA-gated chloride channels of insects and vertebrates. *British Journal of Pharmacology*, **121**, 1496-1505.
- RAYMOND, V., SATELLE, D.B. & LAPIED, B. (2000). Co-existence in DUM neurones of two GluCl channels that differ in their picrotoxin sensitivity. *Neuroreport*, **11**, 2695-2701.
- RAYMOND, V. & SATELLE, D.B. (2002). Novel animal-health drug targets from ligand-gated chloride channels. *Nature Reviews Drug Discovery*, **1**, 427-36.
- RENNO, W.M., MULLETT, M.A. & BEITZ, A.J. (1992). Systemic morphine reduces GABA release in the lateral but not the medial portion of the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Brain Research*, **594**, 221-232.
- RENNO, W.M., ALKHALAF, M., MOUSA, A. & KANAAN, R.A. (2008). A comparative study of excitatory and inhibitory amino acids in three different brainstem nuclei. *Neurochemical Research*, **33**(1), 150-159.
- RIPPS, H. & SHEN, W. (2012). Taurine: A “very essential” amino acid. *Molecular Vision*, **18**, 2673-86.
- RITZHAUPT, L.K., ROWAN, T.G. & JONES, R.L. (2000a). Evaluation of efficacy of selamectin and fipronil against Ctenocephalides felis in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **217**, 1666-1668.
- RITZHAUPT, L.K., ROWAN, T.G. & JONES, R.L. (2000b). Evaluation of efficacy of selamectin, fipronil, and imidacloprid against Ctenocephalides felis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **217**, 1669-1671.
- ROJAS DE ARIAS, A. & FOURNET, A. (2002). Fipronil insecticide: novel application against Triatomine insect vectors of Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**, 535-539.

- SARANSAARI, P. & OJA, S.S. (1992). Release of GABA and taurine from brain slices. *Progress in Neurobiology*, **38**, 455-482.
- SARANSAARI, P. & OJA, S.S. (2000). Taurine and neural cell damage. *Amino Acids*, **19**, 509-526.
- SARANSAARI, P. & OJA, S. S. (2006). Characteristics of taurine release in slices from adult and developing mouse brain stem. *Amino Acids*, **31**, 35-43.
- SARANSAARI, P. & OJA, S.S. (2008). Taurine in neurotransmission. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, vol. 2, Vizi, E.S. (Ed.), *Neurotransmitter Systems*, 3ª Edición, pp. 325-342.
- SARTHY, P.V. (1991). Histamine: a neurotransmitter candidate for *Drosophila* photoreceptors. *Journal of Neurochemistry*, **57**, 1757-1768.
- SATTELLE, D. (1990). GABA receptors of insects. *Advances in Insect Physiology*, **22**, 1-113.
- SATTELLE, D.B., HARRISON, J.B., CHEN, H.H., BAI, D. & TAKEDA, M. (2000). Immunocytochemical localization of putative gamma-aminobutyric acid receptor subunits in the head ganglia of *Periplaneta americana* using an anti-RDL C-terminal antibody. *Neuroscience Letters*, **289**, 197-200.
- SCHMAHMANN, J.D. (1997). Therapeutic and research implications. *International Review of Neurobiology*, **41**, 637-647.
- SCHARF, M.E., RATLIFF, C.R. & BENNETT, G.W. (2004). Impacts of residual insecticide barriers on perimeter-invading ants, with particular reference to the odorous house ant, *Tapinoma sessile*. *Journal of Economic Entomology*, **97**, 601-605.
- SCHLENK, D., HUGGETT, D.B., ALLGOOD, J., BENNETT, E., RIMOLDI, J., BEELER, A.B., BLOCK, D., HOLDER, A.W., HOVINGA, R. & BEDIENT, P. (2001). Toxicity of fipronil and its degradation products to *Procambarus* sp.: field and laboratory studies. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **41**, 325-332.
- SCHMIDT, S.Y., BERSON, E.L. & HAYES, K.C. (1976). Retinal degeneration in cats fed casein. I. Taurine deficiency. *Investigative Ophthalmology*, **15**, 47-52.
- SCHNEE, M., RAUH, J., BUCKINGHAM, S.D. & SATTELLE, D.B. (1997). Pharmacology of skeletal muscle GABA-gated chloride channels in the cockroach *Periplaneta americana*. *Journal of Experimental Biology*, **200**, 2947-2955.



- SCHOFIELD, P.R., DARLISON, M.G., FUJITA, N., BURT, D.R., STEPHENSON, F.A., RODRIGUEZ, H., RHEE, L.M., RAMACHANDRAN, J., REALE, V., GLENCORSE, T.A., SEEBURG, P.H. & BARNARD, E.A. (1987). Sequence and functional expression of the GABA<sub>A</sub> receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature*, **328**, 221-227.
- SCHURR, A., TSENG, M.T., WEST, C.A. & RIGOR, B.M. (1987). Taurine improves the recovery of neuronal function following cerebral hypoxia: an in vitro study. *Life Sciences*, **40**, 2059-2066.
- SCOTT, J. & WEN, Z. (1997). Toxicity of fipronil to susceptible and resistant strains of German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) and houseflies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, **90**, 1152-1156.
- SERAFINI, R., MARIC, D., MARIC, I., MA, W., FRITSCHY, J.M., ZHANG, L. & BARKER, J.L. (1998). Dominant GABA<sub>A</sub> receptor/Cl<sup>-</sup> channel kinetics correlate with the relative expressions of  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  and  $\beta 3$  subunits in embryonic rat neurones. *The European Journal of Neuroscience*, **10**, 334-339.
- SHELTON, T.G. & GRACE, J.K. (2003). Effects of exposure duration on transfer of nonrepellent termiticides among workers of *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology*, **96**, 456-460.
- SHIMADA, S., CUTTING, C. & UHL, G.R. (1992).  $\gamma$ -Aminobutyric acid A or C receptor?  $\gamma$ -Aminobutyric acid  $\rho 1$  receptor RNA induces bicuculline-, barbiturate, and benzodiazepine-insensitive  $\gamma$ -aminobutyric acid responses in *Xenopus* oocytes. *Molecular Pharmacology*, **41**, 683-687.
- SILVERMAN, J. & LIANG, D. (1999). Effect of fipronil on bait formulation-based aversion in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, **92**, 886-889.
- SIMEONE, T.A., SANCHEZ, R.M. & RHO, J.M. (2004). Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Journal of Child Neurology*, **19**, 343-360.
- SIMON-DELISO, N., AMARAL-ROGERS, V., BELZUNCES, L. P., BONMATIN, J. M., CHAGNON, M., DOWNS, C., FURLAN, L., GIBBONS, D. W., GIORIO, C., GIROLAMI, V., GOULSON, D., KREUTZWEISER, D. P., KRUPKE, C. H., LIESS, M. & LONG, E. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**, 5-34.
- SKOOG, D.A. & LEARY, J.J. (1994). Espectroscopía atómica basada en la atomización con llama y electrotérmica. *Análisis instrumental*. 4ª Edición, McGraw-Hill, 227-260.

- SMALL, G.W., RABINS, P.V., BARRY, P.P., BUCKHOLTZ, N.S., DEKOSKY, S.T., FERRIS, S.H., FINKEL, S.I., GWYTHYER, L.P., KHACHATURIAN, Z.S., LEBOWITZ, B.D., MCRAE, T.D., MORRIS, J.C., OAKLEY, F., SCHNEIDER, L.S., STREIM, J.E., SUDERLAND, T., TERI, L.A., TUNE, L.E. (1997). Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. Consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society. *Journal of the American Medical Association*, **278**, 1361-1371.
- SMITH, R.J. (1990). Glutamine metabolism and its physiologic importance. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, **14**, 40S-44S.
- SMITH, K.E., WALL, R., HOWARD, J.J., STRONG, L., MARCHIONDO, A.A. & JEANNIN, P. (2000). In vitro insecticidal effects of fipronil and  $\beta$ -cyfluthrin on larvae of the blowfly *Lucilia sericata*. *Veterinary Parasitology*, **88**, 261-268.
- SNELL, R.S. (2006). Neuroanatomía clínica -6ª ed- Editorial Médica Panamericana (Buenos Aires), 244-265.
- SOLIEMANI, N., MOSLEM, A., SHAMSIZADEH, A. & AZHDARI-ZARMEHRI, H. (2016). Administration of orexin receptor 1 antagonist into the rostral ventromedial medulla increased swim stress-induced antinociception in rat. *Iranian Journal of Basic Medicine Science*, **19**(5), 542-9.
- SONNEWALD, U., KONDZIELLA, D. (2003). Neuronal glial interaction in different neurological diseases studied by *ex vivo*  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine*, **16**, 424-429.
- SONNEWALD, U., WESTERGAARD, N., SCHOUSBOE, A., SVENDSEN, J.S., UNSGARD, G. & PETERSEN, S.B. (1993). Direct demonstration by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy that glutamine from astrocytes is a precursor for GABA synthesis in neurons. *Neurochemistry International*, **22**, 19-29.
- SOSA-ORTIZ, A.L., ACOSTA-CASTILLO, I. & PRINCE, M.J. (2012). Epidemiology of dementias and Alzheimer's disease. *Archives of Medical Research*, **43**(8), 600-8.
- SQUIRES, R.F., CASIDA, J.E., RICHARDSON, M. & SAEDERUP, E. (1983).  $^{35}\text{S}$ -*t*-butylbicyclopophosphorothionate binds with high affinity to brain specific sites coupled to  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> and ion recognition sites. *Molecular Pharmacology*, **23**, 326-336.
- STEVENS, M.M., HELLIWELL, S. & WARREN, G.N. (1998). Fipronil seed treatments for the control of chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in aerially-sown rice crops. *Field Crops Research*, **57**, 195-207.
- STEVENS, M.M., FOX, K.M., COOMBES, N.E. & LEWIN, L.A. (1999). Effect of fipronil seed treatment on the germination and early growth of rice. *Pesticide Science*, **55**, 517-523.

- STIPANUK, M.H. (1986). Metabolism of sulfur-containing amino acids. *Annual Review of Nutrition*, **6**, 179-209.
- STOUT, M.J., RICE, W.C., LINScombe, S.D. & BOLlich, P.K. (2001). Identification of rice cultivars resistant to *Lissorhoptrus oryzophilus* (Coleoptera: Curculionidae), and their use in an integrated management program. *Journal of Economic Entomology*, **94**, 963-970.
- STRAMBI, C., CAYRE, M., SATTELLE, D.B., AUGIER, R., CHARPIN, P. & STRAMBI, A. (1998). Immunocytochemical mapping of an RDL-like GABA receptor subunit and of GABA in brain structures related to learning and memory in the cricket *Acheta domesticus*. *Learning & Memory*, **5**, 78-89.
- STURMAN, J.A. (1993). Taurine in development. *Physiological Reviews*, **73**, 119-148.
- SUR, C., QUIRK, K., DEWAR, D., ATACK, J. & MCKERNAN, R.M. (1998). Rat and human hippocampal  $\alpha 5$  subunit-containing GABA<sub>A</sub> receptors have  $\alpha 5\beta 3\gamma 2$  pharmacological characteristics. *Molecular Pharmacology*, **54**, 928-933.
- SUR, C., FARRAR, S.J., KERBY, J., WHITING, P.J., ATACK, J. & MCKERNAN, R.M. (1999). Preferential coassembly of  $\alpha 4$  and  $\delta$  subunits of the  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor in rat thalamus. *Molecular Pharmacology*, **56**, 110-115.
- SZABÓ, M.P.J., MATUSHIMA, E.R., PEREIRA, M.C., WERTHER, K. & DUARTE, J.M.B. (2000). Cat flea (*Ctenocephalides felis*) infestation in quarantined marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) populations. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **31**, 576-577.
- SZE, C., BI, H., KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B.K., FILLEY, C.M., MARTIN, L.J. (2001). N-Methyl-D-aspartate receptor subunit proteins and their phosphorylation status are altered selectively in Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, **182**, 151-159.
- SZEGEDI, V., BÁRDOS, G., DÉTÁRI, L., TÓTH, A., BANCZEROWSKI-PELYHE, I. & VILÁGI I. (2005). Transient alterations in neuronal and behavioral activity following bensultap and fipronil treatment in rats. *Toxicology*, **214**, 67-76.
- TADOLINI, B., PINTUS, G., PINNA, G. G., BENNARDINI, F. & FRANCONI, F. (1995). Effects of taurine and hypotaurine on lipid peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **213**, 820-826.
- TANG, J., USMANI, K.A., HODGSON, E. & ROSE, R.L. (2004). In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. *Chemico-Biological Interactions*, **147**, 319-329.

- TAUDOU, G., WIART, J. & PIAIJEL, J. (1983). Influence of amino acid deficiency and tRNA aminoacylation on DNA synthesis and DNA polymerase activity during secondary immune response in vitro. *Molecular Immunology*, **20**, 255.
- TEICHER, H.B., KOFOED-HANSEN, B. & JACOBSEN, N. (2003). Insecticidal activity of the enantiomers of fipronil. *Pest Management Science*, **59**, 1273-1275.
- THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, **72**, 971-983.
- TILAK, R., TILAK, V.W., YADAV, J.D. & GUPTA, K.K. (2002). Efficacy of fipronil and propoxur in the control of German cockroaches (Dictyoptera: Blatellidae). *The Journal of Communicable Diseases*, **34**, 65-69.
- TINGLE, C.C., ROTHER, J.A., DEWHURST, C.F., LAUER, S. & KING, W.J. (2003). Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **176**, 1-66.
- TOGA, A.W. (1997). Brain-mapping neurotoxicity and neuropathology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **820**, 1-13.
- TROTTI, D., AOKI, M., PASINELLI, P., BERGER, U.V., DANBOLT, N.C., BROWN, R.H.J., HEDIGER, M.A. (2001). Amyotrophic lateral sclerosis-linked glutamate transporter mutation has impaired glutamate clearance capacity. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 576-582
- TRUDEAU, L.E. (2004). Glutamate co-transmission as an emerging concept in monoamine neuron function. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, **29**, 296-310.
- ULLOA-CHACÓN, P. & JARAMILLO, G.I. (2003). Effects of boric acid, fipronil, hydramethylnon, and diflubenzuron baits on colonies of ghost ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology*, **96**, 856-862.
- UNIÓN EUROPEA (2002). Pregunta escrita P-1804/02 de Dominique Souchet (NI) a la Comisión y respuesta del Sr. Fischler. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 12 de diciembre de 2002, pp. 163-164.
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) (1996a). *Fipronil for use on Rice (Regent, Icon) and Pets (Frontline), HED Risk Assessment, Chemical 129121, Barcodes D242090, D245656, D245627, & D241676, Cases 288765, 031271, 060305, & 061662, Submissions*

- S535772, S541670, S541551, S534929. US, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, 90 pp + 3 attachments. Washington DC.
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) (1996b). New Pesticide Fact Sheet-Fipronil. EPA 737-F-96-005, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office Washington, DC, 1–10.
- VALLES, S., KOEHLER, P. & BRENNER, R. (1997). Antagonism of fipronil toxicity by piperonyl butoxide and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, **90**, 1254-1258.
- VAROL, S., ÖZDEMİR, H.H., ÇEVİK, M.U., ALTUN, Y., İBİLOĞLU, İ., EKİNCİ, A., İBİLOĞLU, A.O., BALDUZ, M., ARSLAN, D., TEKİN, R., AKTAR, F., ALUÇLU, M.U. (2016). Protective effects of L-glutamine against toxicity of deltamethrin in the cerebral tissue. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, **12**, 1005-11.
- VEGA, S.Y. & RUST, M.K. (2003). Determining the foraging range and origin of resurgence after treatment of Argentine ant (Hymenoptera: Formicidae) in urban areas. *Journal of Economic Entomology*, **96**, 844-849.
- VINCENZI, P. & GENCHI, C. (1997). Efficacy of fipronil (Frontline®) against ear mites (Otodectes cynotis) in dogs and cats. In: Proceedings of the 14th Annual Congress of the ESVD-ECDV, Pisa, Italy, p. 177.
- VOLZ, D.C., WIRTH, E.F., FULTON, M.H., SCOTT, G.I., STROZIER, E., BLOCK, D.S., FERRY, J.L., WALSE, S.S. & CHANDLER, G.T. (2003). Effects of fipronil and chlorpyrifos on endocrine-related endpoints in female grass shrimp (Palaemonetes pugio). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **71**, 497-503.
- VON BOHLEN UND HALBACH, O. & DERMIETZEL, R. (2002a). *Neurotransmitters and Neuromodulators. Handbook of Receptors and Biological Effects*. Wiley-VCH, Weinheim.
- VON BOHLEN UND HALBACH, O. & DERMIETZEL, R. (2002b). GABA ( $\gamma$ -amino butyric acid). In: *Neurotransmitters and Neuromodulators: Handbook of Receptors and Biological Effects*, Von Bohlen Und Halbach, O. & Dermietzel, R. (Eds.), Wiley-VCH, Weinheim, pp. 64-74.
- WAAGEPETERSEN, H.S., SONNEWALD, U., GEGELASHVILI, G., LARSSON, O.M. & SCHOUSBOE, A. (2001). Metabolic distinction between vesicular and cytosolic GABA in cultured GABAergic neurons using <sup>13</sup>C magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Neuroscience Research*, **63**, 347–355.
- WALLACE, A.A., BARRICK, R.A. & JEANNIN, P. (2000). A comparative study of Frontline® Top Spot™ and Revolution™ in the control of flea and tick infestations on dogs.

- Proceedings of the WSAVA/FECAVA Congress, 25-29 April 2000*, Amsterdam, The Netherlands.
- WALLS, A.B., EYJOLFSSON, E.M., SMELAND, O.B., NILSEN, L.H., SCHOUSBOE, I., SCHOUSBOE, A., SONNEWALD, U. & WAAGEPETERSEN, H.S. (2011). Knockout of GAD65 has major impact on synaptic GABA synthesized from astrocyte-derived glutamine. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, **31**(2), 494–503.
- WANG, X., MARTÍNEZ, M.A., WU, Q., ARES, I., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., ANADÓN, A. & YUAN, Z. (2016). Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Critical Reviews in Toxicology*, **90**, 81-101.
- WEI, Y., APPEL, A.G., MOAR, W.J. & LIU, N. (2001). Pyrethroid resistance and cross-resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* (L). *Pest Management Science*, **57**, 1055-1059.
- WHITING, P.J., BONNERT, T.P., MCKERNAN, R.M., FARRAR, S., LE BOURDELLES, B., HEAVENS, R.P., SMITH, D.W., HEWSON, L., RIGBY, M.R., SIRINATHSINGHI, D.J., THOMPSON, S.A. & WAFFORD, K.A. (1999). Molecular and functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **868**, 645–653.
- WHITTLE, A.J., FITZJOHN, S., MULLIER, G., PEARSON, D.P.J., PERRIOR, T.R., TAYLOR, R. & SALMON, R. (1995). The use of computer-generated electrostatic surface maps for the design of new GABA-ergic insecticides. *Pesticide Science*, **44**, 29-31.
- WINBLAD, B., AMOUYEL, P., ANDRIEU, S., BALLARD, C., BRAYNE, C., BRODATY, H., CEDAZO-MINGUEZ, A., DUBOIS, B., EDVARDSSON, D., FELDMAN, H., FRATIGLIONI, L., FRISONI, G.B., GAUTHIER, S., GEORGES, J., GRAFF, C., IQBAL, K., JESSEN, F., JOHANSSON, G., JÖNSSON, L., KIVIPELTO, M., KNAPP, M., MANGIALASCHE, F., MELIS, R., NORDBERG, A., RIKKERT, M.O., QIU, C., SAKMAR, T.P., SCHELTENS, P., SCHNEIDER, L.S., SPERLING, R., TJERNBERG, L.O., WALDEMAR, G., WIMO, A. & ZETTERBERG, H. (2016). Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *The Lancet Neurology*, **15**(5), 455-532.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2001). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2000-2002. WHO/PCS/01.5.
- WISDEN, W., LAURIE, D.J., MONYER, H.M. & SEEBURG, P.H. (1992). The distribution of 13 GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs in rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *The Journal of Neuroscience (The Official Journal of the Society for Neuroscience)*, **12**, 1040-1062.
- WOLFF, M. & WINGATE, V. (1998). Characterization and comparative pharmacological studies of a functional  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptor cloned from the tobacco

- budworm, *Heliothis virescens* (Noctuidae: Lepidoptera). *Invertebrate Neuroscience*, **3**, 305-315.
- WOODWARD, R.M., POLENZANI, L. & MILEDI, R. (1992). Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive (p-like)  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. 1. Effects of Cl<sup>-</sup> channel inhibitors. *Molecular Pharmacology*, **42**, 165-173.
- WOODWARD, R.M., POLENZANI, L. & MILEDI, R. (1993). Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive (p-like)  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. II. Pharmacology of  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> and  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>B</sub> receptor agonists and antagonists. *Molecular Pharmacology*, **43**, 609-625.
- WU, H., JIN, Y., WEI, J., JIN, H., SHA, D., WU, J.-Y. (2005). Mode of action of taurine as a neuroprotector. *Brain Research*, **1038**, 123-131.
- WU, J.Y. & PRENTICE, H. (2010). Role of taurine in the central nervous system. *Journal of Biomedical Science*, **17**(Suppl 1), S1.
- WU, J.Y., TANG, X.W., SCHLOSS, J.V. & FAIMAN, M.D. (1998). Regulation of taurine biosynthesis and its physiological significance in the brain. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **442**, 339-45.
- YAGÜE, J.I. & BOLIVAR, C. (2002). Guía práctica de insecticidas, acaricidas y nematocidas, *Mundi-Prensa*, Madrid.
- YAMORI, Y., TAGUCHI, T., HAMADA, A., KUNIMASA, K., MORI, H. & MORI, M. (2010). Taurine in health and diseases: consistent evidence from experimental and epidemiological studies. *Journal of Biomedical Science*, **17**, Suppl 1S6.
- YANASE, D. & ANDOH, A. (1989). Porphyrin synthesis involvement in diphenyl ether-like mode of action of TNPP-ethyl, a novel phenylpyrazole herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **35**, 70-80.
- YING, G-G. & KOOKANA, R.S. (2001). Sorption of fipronil and its metabolites on soils from South Australia. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Rood Contaminants, and Agricultural Wastes*, **36**, 545-558.
- YI, G.F. & ALLEE, G.L. (2002). Revisión de Literatura Glutamina (Gln) y Glutamato (Glu). *Ajinomoto*.
- YOUNG, D.R., ARTHUR, R.G. & DAVIS, W.L. (2003). Evaluation of K9 Advantix<sup>TM</sup> vs. Frontline Plus<sup>®</sup> topical treatments to repel brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) on dogs. *Parasitology Research*, **90** (Suppl. 1), S116-S118.

- ZAKSON-AIKEN, M., GREGORY, L.M. & SHOOP, L. (2000). Development of an assay for the screening of compounds against larvae of the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). *Journal of Medical Entomology*, **37**, 571-574.
- ZHANG, H-G., FFRENCH-CONSTANT, R. & JACKSON, M. (1994). A unique amino acid of the *Drosophila* GABA receptor with influence on drug sensitivity by two mechanisms. *The Journal of Physiology*, **479**, 65-75.
- ZHANG, H.G., LEE, H.J., ROCHELEAU, T., FFRENCH-CONSTANT, R.H. & JACKSON, M.B. (1995). Subunit composition determines picrotoxin and bicuculline sensitivity of *Drosophila*  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors. *Molecular Pharmacology*, **48**, 835-840.
- ZHAO, X., SALGADO, V.L., YEH, J.Z. & NARAHASHI, T. (2003). Differential actions of fipronil and dieldrin insecticides on GABA-gated chloride channels in cockroach neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **306**, 914-924.
- ZHAO, X., SALGADO, V.L., YEH, J.Z. & NARAHASHI, T. (2004a). Kinetic and pharmacological characterization of desensitizing and non-desensitizing glutamate-gated chloride channels in cockroach neurons. *NeuroToxicology*, **25**, 967-80.
- ZHAO, X., YEH, J.Z., SALGADO, V.L. & NARAHASHI, T. (2004b). Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **310**, 192-201.
- ZHENG, Y., HIRSCHBERG, B., YUAN, J., WANG, A., HUNT, D., LUDMERER, S., SCHMATZ, D. & CULLY, D. (2002). Identification of two novel *Drosophila melanogaster* histamine-gated chloride channel subunits expressed in the eye. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 2000-2005.
- ZHENG, Y., PRIEST, B., CULLY, D.F. & LUDMERER, S.W. (2003). RdlDV, a novel GABA-gated chloride channel gene from the American dog tick *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **33**, 595-599.
- ZULLI, A. (2011). Taurine in cardiovascular disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, **14**, 57-60.
- ZWINGMANN, C. & BUTTERWORTH, R. (2005). An update on the role of brain glutamine synthesis and its relation to cell-specific energy metabolism in the hyperammonemic brain: further studies using NMR spectroscopy. *Neurochemistry International*, **47**, 19-3.